



Etude par échange isotopique du radical tyrosyle en solution et dans la catalase bovine

Sophie Oppillart

► To cite this version:

Sophie Oppillart. Etude par échange isotopique du radical tyrosyle en solution et dans la catalase bovine. Chimie. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00361211

HAL Id: tel-00361211

<https://theses.hal.science/tel-00361211>

Submitted on 13 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ORSAY

N° D'ORDRE :

<p>Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THESE de DOCTORAT

Présentée par :

Sophie Oppiliart

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY
Discipline : Chimie

*Etude par échange isotopique du radical tyrosyle en solution et dans
la catalase bovine*

Soutenue le 22 Novembre 2007 devant la commission d'examen :

MM. Pr Bernard Tilquin
Dr Jean-Luc Ravanat
Pr Michel Thérissod
Dr Bernard Rousseau
Dr Jean-Christophe Cintrat

Rapporteur
Rapporteur
Président du jury
Directeur de thèse
Examineur

Remerciements

Un travail ne s'effectuant jamais seul, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à la conduite et à l'aboutissement de ma thèse. J'ai eu plaisir à travailler au sein du Service de Chimie Bioorganique et de Marquage.

J'ai en premier lieu une pensée très émue pour Charles Mioskowski, qui a permis d'effectuer mon doctorat au sein de son service.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Bernard Rousseau et Jean-Christophe Cintrat, qui, en m'intégrant dans leur équipe, m'ont donné les clefs d'une expérience de thèse réussie malgré les difficultés rencontrées. Je leur suis en particulier reconnaissante de m'avoir laissé une grande liberté de manœuvre et m'avoir fait confiance tout en sachant me réorienter et me stimuler au cours de ces trois années. J'ai particulièrement apprécié leur dynamisme, qui fait du laboratoire un endroit à la fois agréable et motivant, leurs qualités scientifiques et humaines ainsi que leur disponibilité.

J'adresse mes sincères remerciements à Bernard Tilquin et Jean-Luc Ravanat pour l'honneur qu'ils m'ont fait de juger mon travail en acceptant le rôle de rapporteur, ainsi qu'à Michel Thérissod pour avoir présider mon jury de thèse.

Je tiens à remercier profondément mes collaborateurs qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Anabella Ivancich m'a initiée à la biochimie des catalases et à la RPE. Elle m'a, de ce fait, beaucoup appris et elle est intervenue au cours de ma thèse pour m'aider à mettre au point mes expériences avec la précision et la rigueur qui la caractérisent. Dans le même temps, je souhaite remercier Julie Colin pour le temps qu'elle m'a consacré pour effectuer des expériences de spectrophotométrie. J'ai énormément apprécié collaborer avec Serge Pin et Jean-Philippe Renault, aussi bien d'un point de vue personnel que professionnel. Ils m'ont apporté leur savoir-faire et leurs compétences scientifiques pour concevoir et effectuer toutes les expériences de radiolyse, qui ont conduit au cours de ma dernière année de thèse à des résultats intéressants. Ceux-ci n'auraient pu être obtenus sans l'aide d'Abdelkrim Meddour et Jacques Courtieu qui nous ont apporté leur compétence en RMN du deutérium. Merci à Robert Thaï de m'avoir permis d'effectuer du séquençage de peptides toujours dans la bonne humeur, et à Fabrice Beau pour avoir effectué de l'imagerie radioactive.

Je souhaite également remercier les personnes qui m'ont aidée au quotidien pour la réussite de mon travail. Elizabeth Zekri et David Buisson ont énormément contribué à ma thèse par la mise au point des méthodes analytiques, notamment en spectrométrie de masse. Florence Pillon m'a très bien secondée en synthèse organique et, d'un point de vue plus personnel, en qualité de voisine de paillasse, m'a permis de vivre de bons moments au quotidien. Pour les mêmes raisons, surtout pour sa bonne humeur et

sa constance (!), je voudrais remercier Guillaume Mousseau, qui a toujours été là pour apporter des réponses à mes questions ou m'aider au labo, même les jours de grande tempête.

Pour être brève, je voudrais enfin remercier toutes les personnes du service, avec lesquelles j'ai été amenée à travailler et à côtoyer au cours de mes trois années de doctorat, que ce soit le personnel du service technique, des laboratoires "C", de la chimie combinatoire, de l'extension et de l'analyse. Je tenais à remercier en particulier Chantal pour avoir réglé toutes les tracasseries administratives et bien entendu l'ensemble du laboratoire "H".

A ce propos, je voudrais dire merci à Jean-Christophe, que, même s'il court moins vite que moi, il n'en demeure pas moins un très bon encadrant; à Bernard, pour sa disponibilité malgré un emploi du temps chargé et son soutien; à Eric, pour ses questions sur le devenir du radical et sa familiarité accrue lors de pots de thèse (!); à Florence pour, entre autres, ses financiers; à Guillaume, pour son célèbre lancer de lunettes; à Emilie pour être venue assister à ma thèse un jour de grève des trains et sa faculté à remonter le moral; à Cécilia, pour son humour mordant; à Aude, pour sa faculté à pousser la chansonnette; à Marie-Laure, pour son rire communicatif; à Emerson, pour sa gentillesse et ses jeux de mots célèbres et presque toujours drôles; à Fabien, pour sa joie de vivre au quotidien et ses diverses invitations à déguster des bières belges; à Stéphane, pour son humour caustique; à Julia, pour les discussions intenses en salle d'HPLC; à Aurélie, pour d'autres discussions intenses autour d'un bon café; à Julien, pour avoir évité de me couper une oreille lors d'un séjour épique au ski; à Alex, le plus cool des Australiens; à Melinda, pour m'avoir incité à m'inscrire à la chorale; à Nico, pour m'avoir encouragée et supportée.

Pour terminer, un grand merci à ceux qui m'entourent depuis de nombreuses années, qui ont suivi toutes mes aventures et qui, au jour le jour, tout au long de ces trois ans, ont fait abstraction de mes sautes d'humeur pour me sortir la tête de ma thèse; à mes plus fidèles amis, parisiens, lyonnais, aixois, bordelais, bruxellois, californiens, espagnols, angolais, anglais et écossais; à ma sœur Sabine, qui est toujours là dans les moments difficiles; à mes parents, pour leur soutien et leur protection.

Liste des Abréviations

^1H ou H	Atome d'hydrogène
^2H ou D	Atome de deutérium
^3H ou T	Atome de tritium
Å	Angström
AA	Acide aminé
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AS	Activité spécifique
AsfI	Anti silencing fonction 1
ATP	Adénosine triphosphate
BLC	Beef Liver Catalase
Bq	Becquerel
C\cdot	Radical carbo-centré
Chl	Chlorophylle
Da	Dalton
DBNBS	Acide 3,5-dibromo-4-nitrosobenzène sulfonique
DCM	Dichlorométhane
DFT	Density Functional Theory
DME	Diméthoxy éthylène glycol
DMPO	5,5-diméthyl-1-pyrrolidine N-oxyde
DNS	Dansyl
DO	Densité Optique
DOPA	Dihydroxyphénylalanine
DTT	Dithiothréitol
E. Coli	Escherichia Coli
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ENDOR	Electron Nuclear DOuble Resonance
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
éq.	équivalent
ESEEM	Electron Spin Echo Envelope Modulation
ESI	Electrospray Ionization
eV	electron Volt
FAD	Flavine adénine dinucléotide
GSH	Glutathion réduit
His	Histidine
HO\cdot	Radical hydroxyle
HPLC	Chromatographie liquide haute performance

HRP	Horseradish Peroxidase
Inc.	Incorporation
Hz	Hertz
MNP	2-méthyl-2-nitrosopropane
MTHF	5,10-méthényltetrahydrofolate
NADPH	β-nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate réduit
NAYA	N-acétyl tyrosinamide
nd	Non déterminé
OMT	O-méthyl tyrosine
PAA	Acide peracétique
PBN	N-tert-butyl-α-phénylnitron
PCET	Proton-Coupled Electron Transfer
PFL	Pyruvate formiate-lyase
PGG2	Prostaglandine
PGHS	Prostaglandine H-synthase
Por	Porphyrine
ppm	partie par million
PSII	Photosystème II
Resp.	Respectivement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNR	Ribonucléotide réductase
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RX	Rayons X
SAM	S-adénosylméthionine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SM ou MS	Spectrométrie de masse
SOMO	Singly Occupied Molecular Orbital
TEMPO•	2,2,6,6-tetraméthylpipéridinyl-1-oxyde
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TOF	Time Of Flight, temps de vol
t_R	Temps de rétention
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Trp	Tryptophane
Tyr ou Y	Tyrosine
UV	Ultraviolet
δ	déplacement chimique

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	7
CHAPITRE I. RADICAUX D'ACIDES AMINES FORMES AU SEIN DES PROTEINES. EXEMPLES ET CARACTERISATIONS.....	11
I. Importance des radicaux d'acides aminés formés dans les systèmes enzymatiques	13
II. Méthodes de détection, de caractérisation et de localisation.....	27
III. Caractéristiques du couple tyrosine/radical tyrosyle	43
Conclusion.....	55
Bibliographie du chapitre I	57
CHAPITRE II. MARQUAGE DU SITE ACTIF DE LA CATALASE DE FOIE DE BŒUF	65
I. La catalase de foie de bœuf.....	67
II. Etude du marquage au tritium du centre actif de la BLC	78
Bibliographie du chapitre II.....	97
CHAPITRE III. CONCEPTION ET SYNTHESE DE COMPOSES REDUCTEURS. APPLICATION AU TRANSFERT D'HYDROGENE AU RADICAL TYROSYLE DE LA CATALASE DE FOIE DE BŒUF	99
I. Composés polaires ou hydrosolubles capables de réduire un radical aromatique.....	101
II. Synthèse de composés organométalliques	108
III. Etude de la réactivité du radical tyrosyle de la BLC vis-à-vis des différents réducteurs	112
IV. Etude de la réactivité du radical tyrosyle en solution vis-à-vis des différents réducteurs.....	121
Conclusion	133
Bibliographie du chapitre III	135
CHAPITRE IV. PHENOMENE D'AUTOREPARATION DE LA TYROSINE.....	139
I. Rappels bibliographiques : dégradation et régénération de la tyrosine.....	141
II. Autoreparation de la tyrosine	153
Conclusion	177
Bibliographie du chapitre IV	179
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	183
CHAPITRE V. MATERIEL ET METHODES	187

I. Spécifications et préparations générales.....	189
II. Produits commerciaux	191
III. Procédures expérimentales pour la purification de la BLC.....	191
IV. Procédures expérimentales pour les expériences de RPE	193
V. Procédures expérimentales pour les expériences de spectrophotométrie UV-visible et spectrométrie de masse avec la BLC.....	196
VI. Procédures expérimentales pour les expériences de marquage	197
VII. Procédures expérimentales de chimie organique.....	209
VIII. Procédures expérimentales des expériences de radiolyse	223
ANNEXES	235

Introduction générale

L'organisme produit quotidiennement des radicaux aussi bien de manière totalement anarchique que contrôlée. En effet, des espèces radicalaires nocives peuvent être surproduites à la suite d'un dysfonctionnement d'un processus naturel, et conduisent donc à des modifications souvent irréversibles des macromolécules biologiques, que ce soit l'ADN, les protéines ou les lipides. Les conséquences immédiates peuvent être fatales : une rupture double brin de l'ADN conduit parfois à la mort cellulaire. Les effets à long terme sont moins bien connus. Les lésions définitives de l'ADN entraînent des modifications du génome. Pour les protéines, les modifications induites peuvent inhiber ou activer la réplication de gènes par le biais des modifications chimiques de facteurs de transcription. Toutes ces altérations sont susceptibles d'être à la genèse de cancers.

D'un autre côté, il existe toute une biochimie enzymatique reposant sur la formation de radicaux, notamment au sein des protéines. Ces espèces hautement actives possèdent dans ce cas une fonction propre primordiale et ne sont pas considérées, bien au contraire, comme des espèces nuisibles. La chaîne radicalaire est alors contrôlée par les protéines.

C'est pourquoi il est important de connaître les mécanismes de formation et de disparition des radicaux sur les molécules biologiques, pouvant expliquer leur fonction. L'identification et la localisation des résidus intervenant dans le cycle catalytique constituent la première étape vers la compréhension globale du mécanisme par l'attribution du rôle joué par le radical en question.

Depuis les travaux pionniers de Sjöberg sur le radical tyrosyle de la ribonucléotide réductase, le nombre des méthodes analytiques a explosé pour permettre l'étude des radicaux, faisant souvent appel à des techniques spectroscopiques combinées à des modifications chimiques. Des réactions élégantes entre deux radicaux ou d'échange isotopique sont apparues dernièrement afin de capturer le radical de manière suffisamment stable pour pouvoir ensuite être analysé de manière univoque.

Nous nous proposons, au cours de ce travail de thèse, d'appréhender de deux manières la chimie du radical tyrosyle. Nous nous sommes focalisés tout particulièrement sur cette entité puisqu'elle est l'espèce radicalaire la plus abondante utilisée comme cofacteur par les enzymes les mieux caractérisées.

Le premier thème étudié est le développement d'une méthode basée sur un échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ qui serait relativement simple à mettre en œuvre et efficace pour permettre la localisation des radicaux formés de manière contrôlée par les enzymes au cours de leur cycle catalytique. Cette méthode repose sur la réparation du radical créé par un atome de tritium et devrait permettre d'obtenir rapidement et de manière irréfutable la localisation du résidu

impliqué, en évitant les techniques moins triviales, comme la mutagenèse dirigée.

En parallèle, nous avons choisi d'étudier le comportement du radical tyrosyle en solution pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents intervenant au cours de la méthode d'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$. Cette étude nous a permis de mettre à jour un mécanisme d'autoréparation de la tyrosine jusque là inconnu.

Dans le premier chapitre, nous détaillerons quelques exemples d'enzymes fonctionnant avec des radicaux protéiques comme cofacteurs. Puis nous exposerons les méthodes les plus usuelles d'étude des radicaux protéiques, aidant à la découverte de leur nature chimique, de leur localisation et de leur responsabilité dans le cycle catalytique.

En particulier, nous tenterons dans le chapitre II, de confirmer le site de formation du radical tyrosyle dans la catalase de foie de bœuf par notre approche basée sur l'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ combinée avec la spectroscopie paramagnétique électronique (RPE). Cette enzyme a été choisie comme enzyme modèle car le radical formé n'a pas été entièrement caractérisé.

Nous discuterons ensuite dans le chapitre III de l'amélioration de la méthode de marquage détaillée auparavant.

Le dernier chapitre dévoilera les résultats obtenus sur le radical tyrosyle en solution et la découverte d'un mécanisme d'autoréparation de cet acide aminé.

Chapitre I. Radicaux d'acides aminés formés au sein des protéines. Exemples et caractérisations

I. Importance des radicaux d'acides aminés formés dans les systèmes enzymatiques

Certains radicaux portés par des acides aminés de la chaîne polypeptidique sont formés de manière transitoire lors de réactions de catalyse dans les systèmes enzymatiques.¹ Les radicaux protéiques sont capables d'activer des liaisons et des réarrangements moléculaires dans un grand nombre d'enzymes. L'environnement du radical joue un rôle important dans la modulation de ses propriétés et de sa réactivité.² Le premier radical organique, porté par un résidu acide aminé détecté, a été le radical tyrosyle de la ribonucléotide réductase. Auparavant, seuls les cofacteurs tels que les formes semi-quinones des flavines et quinones étaient considérés comme intervenant dans les catalyses enzymatiques.³ Depuis, d'autres radicaux portés par des amino-acides ont été découverts, sur des résidus glycine, cystéine et tryptophane (Figure I-1) ainsi que des acides aminés modifiés (tyrosine, tryptophane).⁴ Il est clair que ces résidus sont les plus utilisés par les enzymes puisqu'ils sont parmi les plus sensibles à l'oxydation, donc les plus enclins à effectuer des transferts d'électrons.

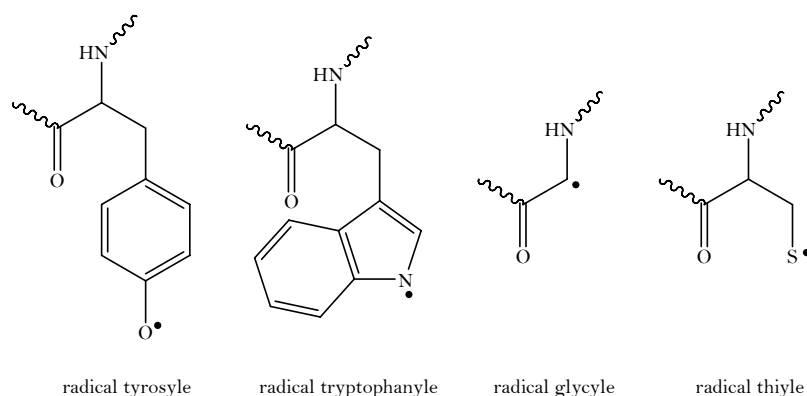


Figure I-1 : radicaux protéiques

Les enzymes catalysant des processus impliquant des étapes d'oxydation ou de réduction à un électron sont susceptibles de former au cours du cycle catalytique des espèces radicalaires portées par des résidus acides aminés. Ces radicaux ont, pour la plupart, été caractérisés en premier lieu par spectroscopie RPE. Le rôle joué par ces résidus reste souvent à élucider. Nous illustrerons par quelques exemples la présence de radicaux protéiques dans les enzymes les mieux caractérisées et nous montrerons le rôle de ces cofacteurs. Toutes les techniques de caractérisation seront ensuite exposées. Enfin, dans une dernière partie, nous nous intéresserons aux propriétés du radical tyrosyle.

I.1. Exemples de radicaux tyrosyle (Tyr[•] ou Y[•])

I.1.1. Ribonucléotide réductase

Le premier radical d'acide aminé a été mis en évidence chez l'enzyme aérobie ribonucléotide réductase d'*E. Coli* (RNR) en 1972 par spectrophotométrie UV-visible et spectroscopie RPE. L'enzyme, constituée de deux sous-unités homodimériques R1 et R2, où le site actif renferme un dimère de fer ($\text{Fe}^{2+}\text{-O-Fe}^{2+}$), catalyse la réduction des quatre ribonucléotides diphosphates en leurs 2'-désoxyribonucléotides associés. Elle joue donc un rôle central dans la réplication et la réparation de l'ADN.⁵

Pendant le cycle catalytique, l'équipe de Sjöberg a observé l'apparition d'un pic d'absorption intense à 410 nm ainsi que l'apparition d'un doublet asymétrique en RPE centré en $g=2,004$. La forme du signal RPE, sa valeur du tenseur g , son comportement en saturation, sa persistance en solution aqueuse et l'absence de dépendance à la température suggérèrent aux auteurs la présence soit d'un radical libre, tel qu'une semi-quinone ou un radical thiyle, soit d'une structure particulière du fer dans la forme active de l'enzyme. Ce ne fut qu'en 1977 que ce signal fut attribué à un radical tyrosyle.⁶ Dans un premier temps, les auteurs ont cru que le radical se formait sur le carbone benzylique de la tyrosine. Des expériences supplémentaires ont contredit ces résultats et finalement prouvé que le radical était délocalisé sur l'ensemble du cycle aromatique, en position *ortho* et *para* du phénol et sur l'oxygène.⁷

Le radical tyrosyle est impliqué dans le mécanisme catalytique des RNR (Schéma I-1).⁸ La sous-unité R1 possède plusieurs résidus cystéine essentiels pour la catalyse et de nombreux sites de liaison des 2'-désoxynucléotides et de l'ATP. La sous-unité R2 renferme le résidu tyrosyle, site de la formation du radical, et le site actif métallique qui génère et stabilise le radical tyrosyle.⁹

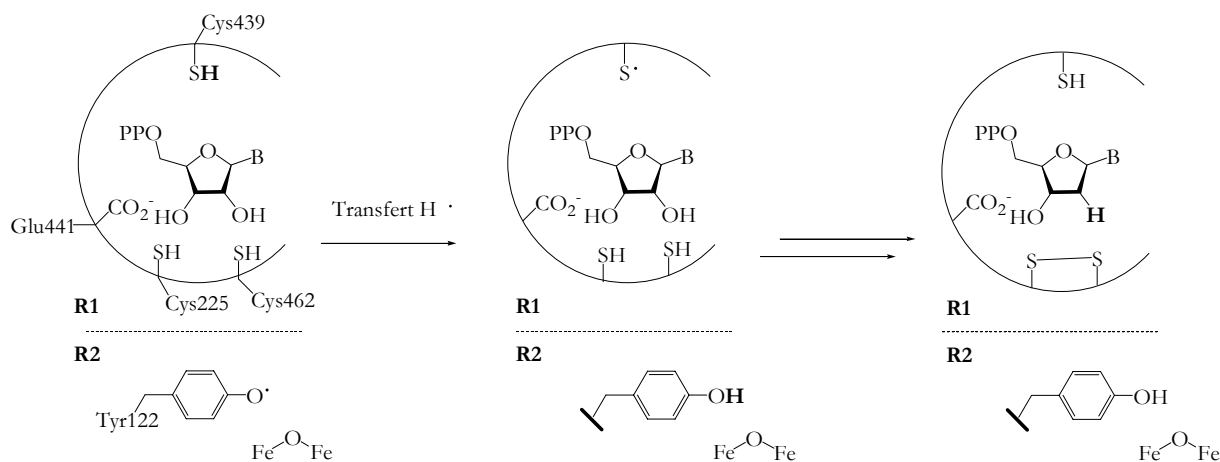


Schéma I-1 : mécanisme simplifié proposé pour la RNR de classe I (tiré de Stubbe, référence 1)

La réduction du dioxygène en eau, permettant la réduction des ribonucléotides par formation du radical tyrosyle, est un processus à quatre électrons, fournis par le cluster ferreux formant $\text{Fe}^{3+}\text{-O-Fe}^{4+}$ (trois électrons) et le résidu tyrosine formant un radical tyrosyle (un électron).¹⁰ Un résidu cystéine de la sous-unité R1 est oxydé en radical thiyle au sein du centre actif de la RNR à partir du résidu tyrosyle de R2.

Les deux acides aminés étant éloignés de 35 Å, d'autres acides aminés (au moins un Trp et trois Tyr) assurent le transfert d'électron entre les deux sites (Figure I-2).¹¹ Récemment, Seyedsayamdost *et al.* ont montré que Tyr356 (par mutation de la tyrosine par de la DOPA) était impliquée dans le transfert d'électron, mais le chemin suivi par ce dernier n'est pas encore totalement élucidé.¹² La réduction du nucléotide peut ainsi avoir lieu. Le radical tyrosyle est ensuite régénéré après chaque cycle.

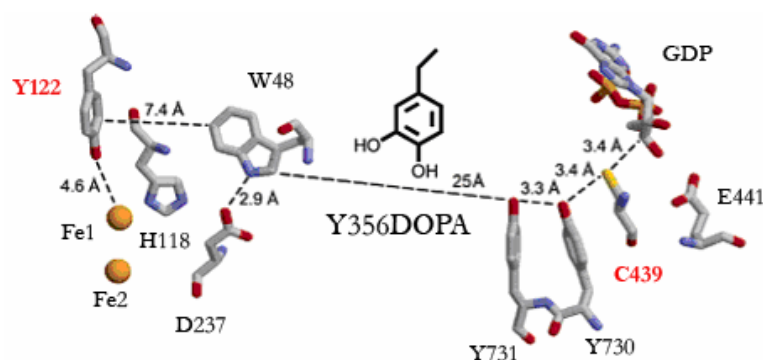


Figure I-2 : Chemin proposé pour l'initiation et la propagation du radical dans la RNR de classe I (tiré de Seyedsayamdost *et al.*, référence 12)

I.1.2. Photosystème II ou eau-plastoquinone photo-oxydoréductase

La photosynthèse dans les milieux aérobies consiste en un transfert d'électrons, induit par la lumière, de molécules d'eau vers le cofacteur NADP^+ . Les systèmes moléculaires agissant de concert pour le transfert d'électrons sont appelés photosystèmes I et II. Ce sont des complexes membranaires contenant de la chlorophylle et un cluster de manganèse qui constitue le site catalytique de la réaction d'oxydation de l'eau.^{13,14} Les électrons ainsi relargués vont servir à la réduction du dioxyde de carbone et à la formation de glucose, tandis que le gradient de protons formé dans le lumen des thylakoïdes va induire une différence de potentiel chimique qui va être utilisée par l'ATP synthase pour produire de l'ATP, dont l'hydrolyse ultérieure libère de l'énergie.¹⁵

Le mécanisme passe par une oxydation de l'eau à quatre électrons. Le photosystème II recueille l'énergie lumineuse *via* le photorécepteur chlorophylle Chl_{D1} pour convertir H_2O en O_2 . Il y a ensuite transfert de charge entre Chl_{D1} et la phéophytine Ph_{D1} , puis formation du

cation chlorophylle P_{D1} , appelé P_{680}^+ (Schéma I-2).

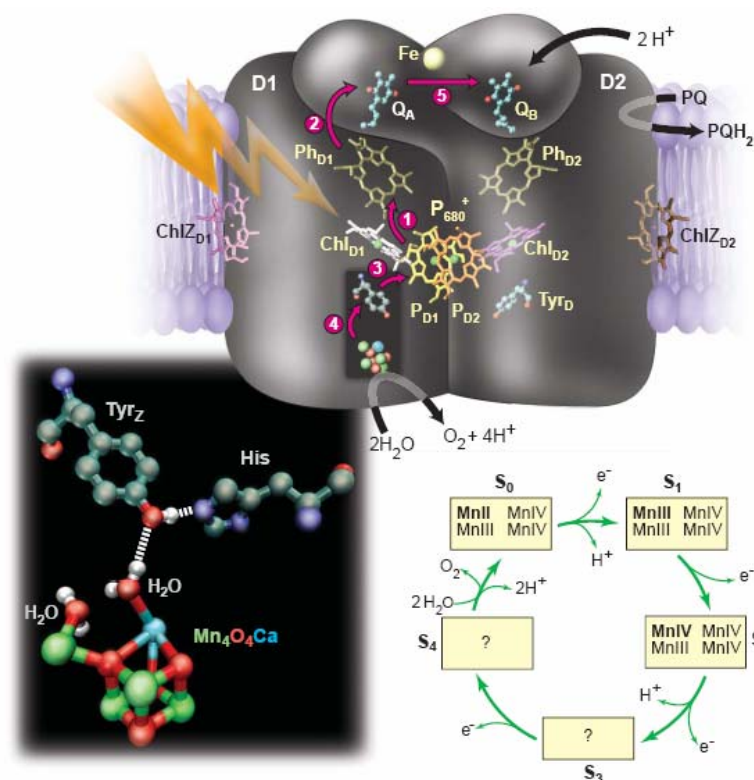


Schéma I-2: Mécanisme de l'oxydation de l'eau en dioxygène (tiré de Rutherford *et al.*, référence 16). 1. Séparation de charge entre Chl_{D1} et Ph_{D1} = formation de P_{680}^+ ; 2. Transfert d'électron de Ph_{D1}^- vers Q_A ; 3. Oxydation de Tyr_Z par P_{680}^+ ; 4. Oxydation du cluster de Mn par $Tyr_Z^{\cdot -}$; 5. Transfert d'électron entre $Q_A^{\cdot -}$ et Q_B

Les travaux de G. T. Babcock et de ses collaborateurs portant sur la compréhension du système rédox O_2/H_2O du photosystème II ont mis en évidence le passage par des espèces radicalaires portées par des résidus tyrosine (Tyr_D et Tyr_Z).¹⁷ Les études spectroscopiques entreprises sur ce système, comme sur les autres enzymes dont le mécanisme passe par des intermédiaires radicalaires, montre que le modèle proposé tient compte de l'état de protonation et de la distribution de densité de spin.¹⁸ La chimie rédox de la tyrosine requiert souvent des transferts de proton au niveau du phénol, que ce soit en solution ou dans les protéines.

Tyr_Z est le donneur d'électron à la chlorophylle P_{680}^+ . Le radical ainsi formé pourrait être directement impliqué dans le mécanisme enzymatique en induisant la rupture de la liaison O-H d'une molécule d'eau liée au cluster de manganèse par capture d'un atome d'hydrogène.¹⁹ Les structures récemment obtenues par diffraction aux rayons X du photosystème II de diverses espèces confirment la localisation de Tyr_Z proche du cluster de manganèse.^{20,21} En revanche, la biologie moléculaire, l'approche comparative et la modélisation donnent des informations plus précises pour tout ce qui concerne les cofacteurs et les données spectroscopiques. Cependant, les données cristallographiques n'ont pas fourni de

renseignements sur le nombre, l'arrangement et la coordination des atomes de manganèse, ni sur la présence de l'atome de calcium.¹⁶ Par contre, les travaux de Ferreira *et al.* ont complété ces lacunes.²²

Tyr_D[•] est formé par transfert d'un électron du cluster de manganèse et a été mis en évidence après induction lumineuse de chloroplastes adaptés à l'obscurité. Le rôle de ce cofacteur a longtemps été méconnu, mais des hypothèses raisonnables sont avancées depuis quelques années. D'une part, le radical semble être un oxydant du cluster Mn au premier stade du cycle rédox, le maintenant ainsi au bon degré d'oxydation lors du cycle mais aussi lors de sa formation, en oxydant les formes trop réduites du manganèse pour pouvoir effectuer la catalyse. D'autre part, Tyr_D[•] pourrait avoir un rôle électrostatique *via* le cation relargué par la formation du radical. Le proton resterait proche du radical et modulerait le potentiel rédox et la localisation du cation porté par la chlorophylle. Tyr_D[•] pourrait donc jouer un rôle de générateur de charge positive dans un environnement hydrophobe.²³

I.1.3. Galactose oxydase

La galactose oxydase est une enzyme monomérique à cuivre catalysant l'oxydation à deux électrons d'une kyrielle d'alcools en aldéhydes avec réduction concomitante de dioxygène en peroxyde d'hydrogène.²⁴ La forme active de l'enzyme contient un atome de cuivre divalent, couplé antiferromagnétiquement avec un radical protéique. L'enzyme est activée par oxydation à un électron, formant un radical tyrosyle. La structure tridimensionnelle de l'enzyme a révélé la présence de deux résidus tyrosines coordonnées au cuivre. L'oxydation *via* O₂ de l'apoenzyme génère le radical sur Tyr495, puis, par transfert de proton, celui-ci est délocalisé sur le résidu tyrosine Tyr272 ponté à une cystéine (Schéma I-3).

Des résultats de spectroscopie RPE haute fréquence couplés à des calculs de modélisation ont montré que la distribution de densité de spin est localisée à la fois sur les deux résidus Tyr et Cys et non uniquement sur le système π de la tyrosine.²⁵

La glyoxal oxydase (conversion d'aldéhyde en alcool et H₂O₂) montre également une tyrosine couplée à une cystéine qui donne un radical lors de la catalyse enzymatique.²⁶

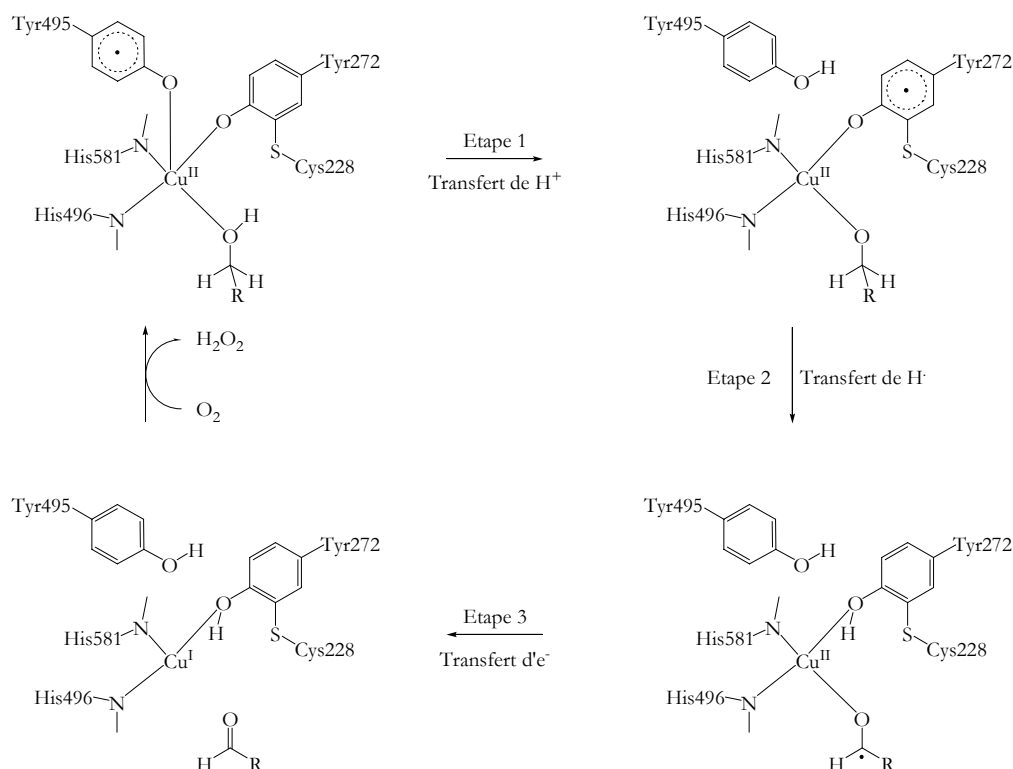


Schéma I-3: Mécanisme de l'oxydation d'alcools en aldéhydes par la galactose oxydase (adapté de Whittaker, référence 27)

I.1.4. Cytochrome c oxydase

La cytochrome c oxydase est une hémoenzyme à cuivre catalysant la réduction à quatre électrons du dioxygène en eau. Trois centres rédox facilitent la réaction, le Cu_A (transfert d'électron), l'hème a (transfert d'électron) et un centre binucléaire comprenant l'hème a_3 - Cu_B (réduction d' O_2), Schéma I-4.

Il a été démontré qu'un radical tyrosyle additionnel est formé et participe à la réaction de réduction du dioxygène.²⁸ En fait, il s'agit d'un résidu tyrosine ponté à un résidu histidine, formé pendant la catalyse enzymatique par réaction du radical tyrosyle sur l'histidine. Ce pontage servirait à maintenir l'architecture du site actif et à moduler les propriétés de la tyrosine en diminuant le pK_a du phénol, facilitant ainsi la formation du radical tyrosyle.²⁹

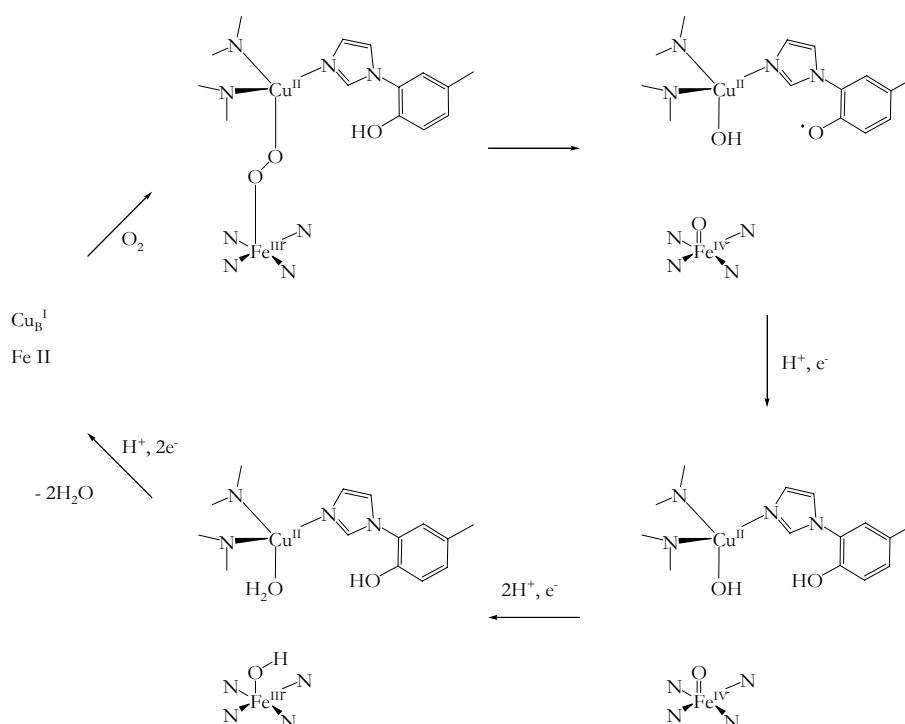


Schéma I-4: Mécanisme de réduction du dioxygène en eau par la cytochrome c oxydase (tiré de Chang *et al.*, référence 30)

I.1.5. Autres systèmes

Hormis la prostaglandine H2 synthase-1 bifonctionnelle (PGHS),[‡] où la fonction du radical tyrosyle comme intermédiaire est indispensable à l'activité cyclooxygénase.^{31,32} D'autres enzymes comme certaines catalases-peroxydases, la P450 cam et les quinoprotéines alcool déshydrogénases³³ fonctionnant avec des radicaux protéiques ont été détectées, mais leur rôle n'est pas encore bien connu.

Les caractérisations spectroscopiques par RPE et ENDOR (*Electron Nuclear DOuble Resonance*) combinées à la mutagenèse dirigée pour les enzymes bactériennes ont notamment permis d'identifier la nature et la localisation, quand cela est possible, de certains radicaux intervenant dans le cycle catalytique. Ainsi elles ont mis en évidence la formation des radicaux Tyr• (et Trp•⁺) pour la cytochrome c peroxydase (CcP),³⁴ la catalase de *Micrococcus luteus* (première mise en évidence par RPE de l'apparition du Composé I pour les catalases),³⁵ la catalase de *Proteus mirabilis*, la catalase de foie de bœuf,^{36,37} les peroxydases KatG,^{38,39} *M. tuberculosis*,⁴⁰ etc. Pour la CcP, il a été montré que le radical Tyr• intervient dans le transfert d'électron entre Trp•⁺ et le cytochrome c simplement et n'a pas de rôle proprement

[‡] Activité cyclooxygénase (conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine PGG₂, important précurseur de prostaglandines) et une activité peroxydase (conversion de peroxydes en alcools)³¹

catalytique.

Les cytochromes P450 sont également des enzymes à hème participant à une grande variété de réactions oxydantes dans l'organisme avec comme finalité une détoxification de l'organisme des xénobiotiques. Spolitak *et coll.* ont observé la formation d'un radical tyrosyle lors de la réaction avec l'acide peracétique, mais celle-ci dépend du pH (présent à pH acide).⁴¹

Wu *et al.* ont extrait du corail une protéine de fusion, possédant un domaine allène oxyde synthase (dont le substrat est l'hydroperoxyde de l'acide arachidonique) et un domaine lipooxygénase (enzyme intervenant dans la première étape de la conversion d'acides gras polyinsaturés en molécules participant à la signalisation cellulaire) présente des similarités de séquences primaires avec les catalases. La caractérisation complète du mécanisme enzymatique a révélé la formation et le rôle d'un radical tyrosyle sur Tyr193.⁴²

I.2. Radicaux glycyle

Les enzymes à radical glycyle sont une famille importante pouvant catalyser toutes sortes de réactions, et permettent aux organismes anaérobies de catalyser des réactions chimiques difficiles sous des conditions anaérobies strictes. Le radical est essentiel pour la catalyse enzymatique et est hautement sensible à l'oxygène. En l'absence d'O₂, le radical peut persister pendant plusieurs heures, car il est stabilisé à la fois par les liaisons peptidiques alentours *via* l'effet capto-datif des substituants voisins (action combinée des effets électrodonneur de NH-R et électroattracteur du carbonyle) et par son enfouissement au sein de la protéine. Ces enzymes sont des protéines de poids moléculaire élevé qui nécessitent une activation post-traductionnelle. On y trouve généralement des clusters fer-soufre. Elles font partie de la superfamille des enzymes radicalaires SAM (S-adénosylméthionine), qui catalysent la coupure réductrice de la SAM en méthionine et radical 5'-désoxyadénosyle. Source de groupements méthyles pour l'alkylation de l'ADN, la biosynthèse d'hormones, de neurotransmetteurs et la régulation de la transduction des signaux, la SAM est aussi initiateur radicalaire des enzymes SAM-dépendantes, permettant ainsi la formation de radicaux glycyle sur des résidus acides aminés.³ Le radical 5'-désoxyadénosyle vient ensuite arracher un hydrogène d'un résidu glycine situé dans la zone C-terminale de l'enzyme. Ce résidu est hautement conservé dans la famille des enzymes à radical glycyle. Lors de la catalyse, le radical glycyle est réduit par une cystéine du centre actif, formant un radical thiyle qui initie la réaction.⁴³

On trouve des radicaux glycyle dans la pyruvate formate-lyase (PFL) convertissant le pyruvate en acétyl-coA et formate, la RNR de classe III anaérobie, la benzylsuccinate

synthase (BSS, catalyseur de la réaction entre toluène et fumarate formant du benzy succinate⁴⁴), la 4-hydroxyphénylacétate décarboxylase (formation du crésol.^{43,45,46}), etc.⁴⁷

La ribonucléotide réductase provenant de cellules d'*E. Coli* cultivées de manière anaérobie est différente de la réductase aérobie bien caractérisée. Sa structure et son mode de fonctionnement sont différents. La conviction que le radical est porté par un résidu glycine (Gly681) a été apportée par comparaison des spectres RPE et des séquences primaires de RNR avec PFL. Les deux enzymes présentent une glycine homologue dans la zone C-terminale, puis par marquage isotopique et mutagenèse dirigée, la nature du radical formé a été totalement élucidée.^{48,49}

I.3. Radicaux tryptophanyle

Les radicaux tryptophanyle sont rencontrés dans plusieurs peroxydases, en particulier la cytochrome c peroxydase (CcP), et l'ADN photolyase. Des radicaux tryptophanyle ont également été détectés dans les catalases-peroxydases telles que *Synechocystis* PCC6803 par RPE multifréquence,^{39,50} la peroxydase de lignine (cofacteur),⁵¹ la peroxydase ascorbate,⁵² etc.

Dans les deux exemples suivants, la fonction du radical est différente. Le radical porté par le tryptophane est un cofacteur pour la CcP, alors que, dans la photolyase, les tryptophanes servent au transfert d'électron.

La cytochrome c peroxydase est la première hémoprotéine dont la structure a été obtenue par diffraction des rayons X. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, avec oxydation concomitante du ferrocyclochrome c (cyt c Fe-(II)) en ferricytochrome c (cyt c Fe-(III)).⁵³ Tout comme les catalases et autres peroxydases, la CcP possède un ion ferrique pentacoordiné. Le mécanisme enzymatique de ces espèces possède des caractéristiques communes par la formation des composés I et II. Le composé I provient de l'oxydation à deux électrons de l'enzyme native ferrique (Fe(III)) par le peroxyde d'hydrogène avec la formation concomitante d'un radical porphyrile (Fe(IV)=O ; Por^{•+}). La formation du composé II (Fe(IV)=O) à la suite d'un transfert électronique d'un résidu acide aminé a été déterminée pour plusieurs familles d'enzymes à activité catalase ou peroxydase (catalase de foie de bœuf, Chapitre II.1 et II.2).

L'observation de la structure cristalline ainsi que des études de mutagenèse dirigée et d'ENDOR ont permis d'affirmer sans ambiguïté que le radical formé lors du cycle catalytique de la CcP est un radical cation Trp^{•+} (Trp191), Schéma I-5.⁵⁴ L'oxydation à deux électrons de la forme ferrique conduit au composé I. Il y a alors transfert d'électron vers le résidu Trp.

Celui-ci intervient dans la réduction du cyt c Fe-(II), par transfert d'électron *via* un radical tyrosyle.

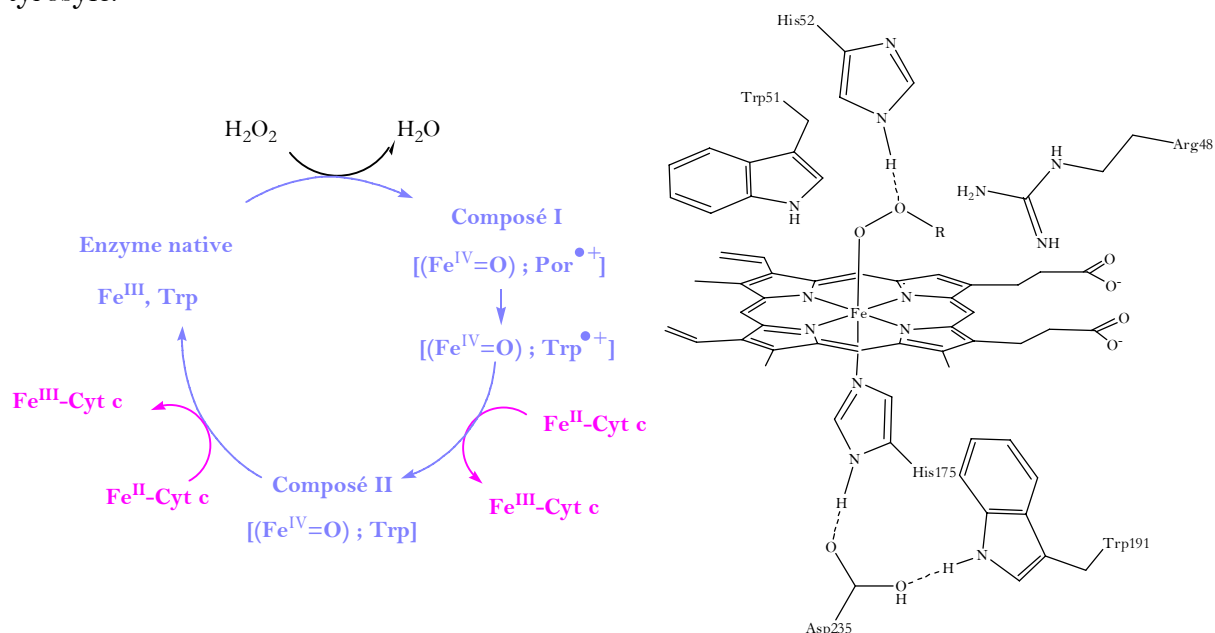


Schéma I-5 : Mécanisme catalytique de la transformation de H_2O_2 en H_2O et oxydation de $\text{Fe}(\text{II})\text{-cyt c}$ par la CcP (gauche) et aperçu du site actif (droite)

L'ADN photolyase catalyse la réparation des dommages induits par irradiation UV de l'ADN, tels que les dimères de pyrimidine formant des cyclobutanes ou d'autres photoproduits, en utilisant l'énergie des rayons ultraviolets proches. L'enzyme possède deux cofacteurs non covalents sensibles à la lumière, la flavine adénine dinucléotide (FAD) et le 5,10-méthényl-tetrahydrofolate (MTHF). L'énergie lumineuse est captée par MTHF, puis transmise à FADH^- . Sous forme excitée, FADH^{*-} transfère l'électron au dimère, le pont cyclobutane est rompu, régénérant d'une part les bases pyrimidines et d'autre part le radical FADH^\bullet . Le radical issu de la flavine après irradiation lumineuse capte un électron à un tryptophane de son environnement (Schéma I-6).

Le transfert d'électron se poursuit sur trois tryptophanes adjacents avant d'être transmis au solvant par le dernier tryptophane (sous forme de radical cation), puis on observe un transfert de proton.⁵⁵ Des études de mutagenèse dirigée associées à de la spectroscopie d'absorption résolue en temps ont permis de mettre en évidence l'apparition des radicaux $\text{Trp}^{\bullet+}$.

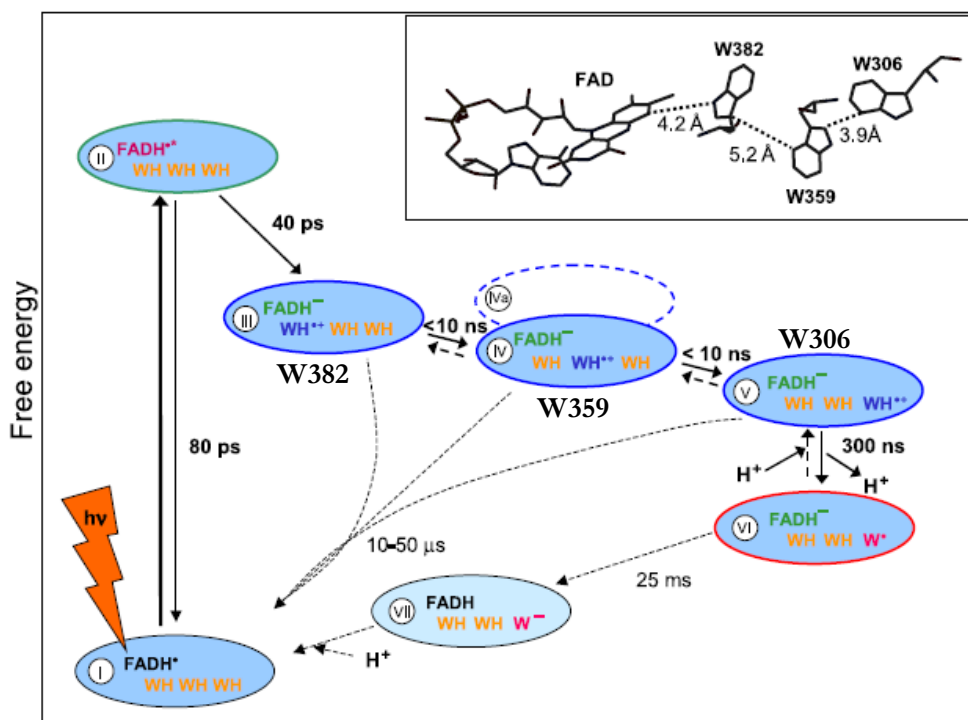


Schéma I-6 : Mécanisme proposé de transfert d'électron relayé par trois tryptophanes de l'ADN photolyase. Traits pleins : réactions successives, traits en pointillés : recombinaison des charges (Tiré de Byrdin *et al.*, référence 56)

I.4. Radicaux thiyle

Le radical thiyle est une espèce transitoire capable d'arracher un hydrogène sur des positions activées (positions bis-allyliques, désoxyribose) où l'énergie de dissociation de la liaison est de 82 kcal.mol⁻¹ (énergie de dissociation homolytique de la liaison S-H de l'ordre de 90 kcal.mol⁻¹).⁴ D'autre part, les radicaux thiyle sont capables d'arracher un hydrogène avec des vitesses de réaction de l'ordre de 10⁴ M⁻¹.s⁻¹, mais cette capacité est masquée par la réaction inverse de don d'hydrogène par la liaison S-H. Cependant, si la réaction de capture d'un hydrogène est suivie d'un processus irréversible rapide, alors la vitesse de réaction augmente.

Dans les RNR, le radical thiyle est généré par transfert d'électron, soit d'un radical tyrosyle (RNR de classe I), soit d'adénosylcobalamine (classe II), soit d'un radical glycyle (classe III). Il permet de réduire le ribonucléotide en 2'-désoxyribonucléotide. Des résidus cystéine sont aussi essentiels dans la catalyse enzymatique de la pyruvate formiate-lyase.^{57,58}

Les protéines contenant des groupements sulfhydryle sont très sensibles aux attaques radicalaires, conduisant à leur inactivation. Ainsi, on observe des radicaux thiyle dans la myoglobine humaine, en plus de radicaux tyrosyle et tryptophanyle, lors de l'ajout de peroxyde d'hydrogène. Ce phénomène est dans ce cas considéré comme une réaction parasite

pouvant avoir des effets délétères puisque le produit résultant est un homodimère relié par un pont disulfure intermoléculaire.⁵⁹

I.5. Rôle dans le métabolisme

A quoi servent ces cofacteurs protéiques, espèces très oxydantes ? Muter un acide aminé, siège de la réaction radicalaire pendant la réaction enzymatique, en un autre conduit en général à l'inactivation de l'enzyme. Ils sont donc souvent indispensables à l'activité catalytique de l'enzyme. Le rôle mécaniste des radicaux portés par des résidus acides aminés serait de permettre une séparation dans l'espace et dans le temps entre les différentes espèces réductrices intervenant dans le cycle catalytique (cofacteurs métalliques et substrat par exemple), qui servirait à effectuer un transfert d'électron contrôlé.⁶⁰ Les espèces radicalaires formées ont des durées de vie assez longues qui permettent aux protéines d'induire des réactions radicalaires sur des sites assez éloignés du lieu de formation du radical primaire. Pour la ribonucléotide réductase de classe I, il a été proposé que la fonction du radical tyrosyle soit de générer un radical thiyle (à une distance de 35 Å), qui, à son tour, initie la réaction catalytique.⁶¹ Tyr[•] jouerait donc le rôle d'un initiateur de réactions en chaîne. Ce fait est plutôt général pour toutes les enzymes étudiées : il s'agit de générer une espèce transitoire capable d'interagir directement avec le substrat. De plus, le radical peut induire un plus grand nombre de cycles lors de la catalyse enzymatique, comme dans le cas de la PGHS.⁶² Pour la majorité des enzymes, le radical est formé et régénère la forme réduite de l'acide aminé à chaque étape du cycle catalytique.

Les radicaux protéiques sont formés lors de la catalyse enzymatique par un processus rédox faisant la plupart du temps intervenir un cofacteur métallique lié à l'enzyme, situé soit sur une autre sous-unité, soit à proximité de l'acide aminé qui va être oxydé ou bien appartenant à une enzyme dite activatrice. Le dioxygène peut initier la réaction via l'oxydation du métal, et dans les cas des systèmes anaérobies où O₂ détruit le centre métallique, d'autres cofacteurs sont utilisés pour engendrer le transfert d'électron initial.

Dans le cas du photosystème II, il est de plus en plus affirmé qu'en plus de son rôle en tant qu'intermédiaire dans le transfert d'électron entre le cluster de manganèse et la chlorophylle, le radical Tyrz[•] pourrait être l'espèce active directement impliquée dans l'oxydation de l'eau.

Le rôle supposé du radical tyrosyle créé lors du cycle catalytique de l'allène oxyde synthase de corail est d'absorber le trop plein d'oxydants par formation du radical lorsque l'enzyme est confrontée à un mauvais substrat, qui va avoir tendance à l'inactiver.⁴²

Pour la catalase bovine, le rôle du radical n'est pas totalement élucidé, puisqu'il se forme à une échelle de temps bien supérieure à celle de la réaction classique de dismutation du peroxyde d'hydrogène.³⁷ Cependant, la théorie la plus probable est que ce radical puisse permettre l'oxydation de substrat différent de H_2O_2 , démontrant ainsi une activité de type peroxydase. D'un point de vue évolutif, cela indique que les catalases monofonctionnelles descendent d'un ancêtre possédant une activité similaire : les catalases-peroxydases.⁶³

Cependant, la théorie plus classique voudrait qu'il intervienne pour inhiber la formation du composé II : le NADPH, présent dans certaines catalases (foie de bœuf, humaine) ne réduit ni le composé I, ni le composé II, mais réduirait le radical tyrosyle. Déterminer la localisation du radical sur de telles enzymes permettrait d'éclaircir son implication dans l'activité de ce type de protéines.

I.6. Formation incontrôlée du radical à la suite d'un dysfonctionnement

On observe également la formation de manière passive de radicaux protéiques par des processus délétères comme le stress oxydant. Pour les protéines, les dommages résultants peuvent être l'oxydation des résidus acides aminés, l'aggrégation des protéines et la perte de leur activité.⁶⁴ Les radicaux ainsi formés peuvent attaquer plusieurs sites sur les acides aminés comme la chaîne latérale ou le squelette, conduisant à différents radicaux d'acides aminés. Les sites d'attaque préférentiels ainsi que les vitesses de réaction des différentes espèces avec les acides aminés libres sont bien connus⁶⁵ ; généralement, l'attaque a lieu à des positions éloignées de l'amine protonée (fort pouvoir désactivant par effet attracteur), donc majoritairement sur la chaîne latérale.

Il est plus ardu de prévoir les sites d'attaque sur les peptides et les protéines, car la notion d'environnement est un facteur primordial (enfouissement des résidus, charges des résidus voisins, du groupement amine terminal,⁶⁶ présence des sites stabilisant les espèces radicalaires). Les protéines contenant des groupements sulfhydryle sont très sensibles aux attaques radicalaires, conduisant à leur inactivation. En plus des résidus cystéine et méthionine, les résidus les plus oxydés sont les résidus tryptophane, tyrosine, histidine.

Sur le Schéma I-7 sont représentées différentes transformations dues à l'attaque du radical hydroxyle, espèce extrêmement oxydante et réactive. Cette espèce réagit directement avec les acides aminés par arrachement d'hydrogène ou addition.

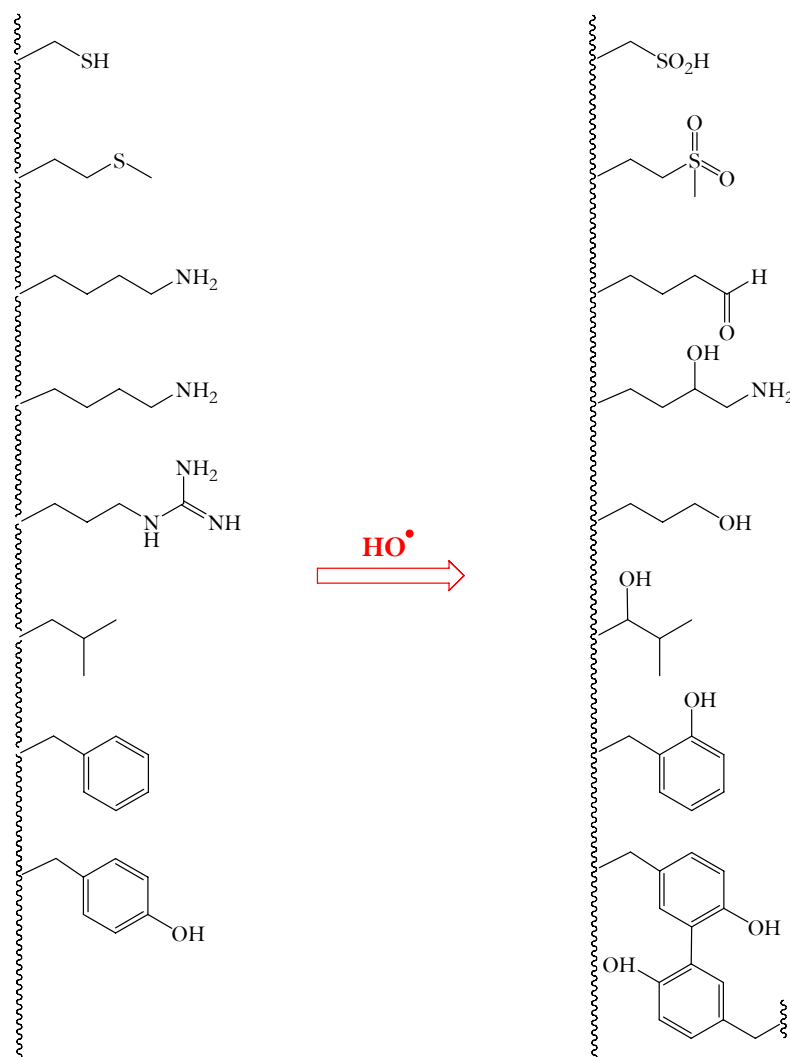


Schéma I-7 : quelques exemples d'oxydation des chaînes latérales d'acides aminés (adapté de Favier, référence 67)

En présence d'oxygène, l'attaque des résidus glycine et alanine par les radicaux HO^\bullet , majoritairement sur le carbone α , conduit souvent à la fragmentation des protéines. Pour la tyrosine, son action conduit à des adduits hydroxylés sur le cycle benzénique et au radical phénoxyle TyrO^\bullet , qui se recombine avec un autre radical tyrosyle pour former un dimère.

Le transfert d'électron d'un acide aminé à un autre permet de former *in fine* les espèces radicalaires les plus stables (comme le radical tyrosyle) avec des durées de vie permettant aux antioxydants de réparer les effets délétères dus aux espèces réactives telles que les radicaux libres.⁶⁸ La tyrosine est un des résidus les plus sensibles ; en plus de la réaction directe avec un radical, elle peut être oxydée par un transfert d'électron intramoléculaire initié par l'oxydation d'autres résidus, comme le tryptophane, formant un radical Trp^\bullet , qui ensuite oxyde un résidu tyrosine. Dans les deux cas, un des produits stables finaux est un dimère de protéine dont le lien est une dityrosine. Il y a compétition entre la dimérisation et un phénomène intramoléculaire inconnu de disparition du radical tyrosyle.⁶⁹

II. Méthodes de détection, de caractérisation et de localisation

II.1. Méthodes spectroscopiques

Les cofacteurs radicalaires protéiques que sont les radicaux glycyle, tyrosyle, tryptophanyle et cystéinyle sont difficiles à caractériser expérimentalement. Cela nécessite la plupart du temps l'utilisation combinée de plusieurs techniques. La biologie moléculaire a permis de surexprimer des protéines naturelles et mutantes, facilitant ainsi la détection et les caractérisations chimiques et cinétiques des intermédiaires radicalaires formés. Nous nous sommes focalisés sur les radicaux tyrosyle.

II.1.1. Spectrophotométrie UV-visible

Comme le spectre UV-visible des espèces radicalaires diffère énormément de la forme réduite de l'acide aminé, il est possible de suivre les apparitions et disparitions des espèces formées durant le cycle catalytique par spectroscopie UV-visible ou de vérifier la présence d'un radical. La Figure I-3 représente le spectre UV-visible de la RNR (sous-unité R2) possédant deux activités enzymatiques différentes. La bande à 410 nm est caractéristique du radical tyrosyle, présent en plus grande quantité dans l'enzyme la plus active (trait plein).⁵

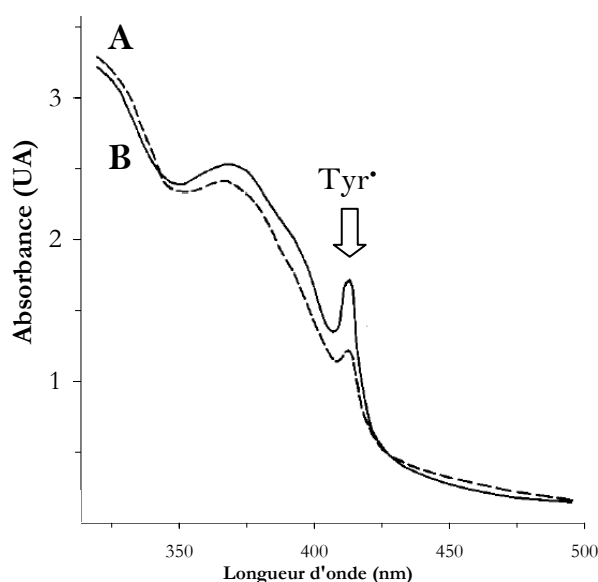


Figure I-3 : spectres d'absorption à température ambiante de la sous-unité R2 de la RNR de classe I. A : activité spécifique 19 800 ; B : activité spécifique 6 900.

II.1.2. Spectroscopie Raman de résonance

L'étude par spectroscopie Raman de résonance de systèmes protéiques est une technique pouvant être utilisée pour observer les radicaux organiques. C'est un outil important

pour l'étude des changements structuraux des chromophores induits au sein des protéines puisqu'il fournit des détails sur leurs modes vibrationnels à travers l'augmentation de l'intensité de certaines résonances Raman. Ainsi une résonance Raman à 1498 cm^{-1} , caractéristique de l'élongation de la liaison C-O du radical tyrosyle déprotoné, a été observée. Elle a aussi permis de confirmer que le radical de la galactose oxydase était une tyrosine couplée à un résidu cystéine par comparaison avec les bandes de résonances Raman obtenues pour le radical 2-thiométhyl-4-méthylphénoxy, corroborant ainsi les données obtenues par ENDOR.⁷⁰ Le faible déplacement de fréquence observé pour la protéine par rapport au composé modèle est dû à l'effet électronique de la coordination par l'ion Cu^{2+} .⁷¹ La glyoxal oxydase possède les mêmes fréquences vibrationnelles à plusieurs longueurs d'onde d'excitation que la galactose oxydase, ce qui a permis de conclure que toutes deux possédaient le même type de radical phénoxy couplé à une cystéine comme ligand du cuivre.²⁶

II.1.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Cette technique a notamment été utilisée pour l'étude des radicaux tyrosyle du photosystème II, en partant du fait que leur formation est photoinduite. De plus, la spectroscopie de résonance Raman n'est pas possible sur ce système en raison de la trop grande fluorescence des chlorophylles.⁷² La fréquence de vibration de la bande attribuée à l'étirement de la liaison C-O du radical tyrosyle reflète la présence ou l'absence ainsi que la force des liaisons hydrogène. Cette fréquence de vibration est sensible à l'environnement protéique, comme le réseau de liaisons hydrogène ou la présence d'un cofacteur métallique. Les bandes à 1503 cm^{-1} et 1512 et 1513 cm^{-1} observées dans le spectre de différence des PSII de *Synechocystis* sauvage et mutant ont été attribuées respectivement à $\text{Tyr}^{\bullet}_{\text{D}}$ et $\text{Tyr}^{\bullet}_{\text{Z}}$.

La comparaison de ces résonances avec celles obtenues pour le radical tyrosyle *in vitro*, en plus de la deutération des radicaux tyrosyle dans le PSII, permet de conclure que les deux radicaux sont enchâssés dans des liaisons H mais avec des forces de liaison différentes.

II.2. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

II.2.1. Spectroscopie RPE utilisée seule

Les espèces mises en jeu étant souvent paramagnétiques, la résonance paramagnétique électronique est une méthode de choix pour l'étude des espèces radicalaires formées. La comparaison du signal RPE obtenu avec les données de la littérature permet de déterminer la nature chimique de l'acide aminé impliqué. Le spectre RPE des radicaux organiques est

caractérisé par l'anisotropie du tenseur g qui peut être résolu seulement à haut champ et les couplages hyperfins des deux protons β de la chaîne latérale et des protons aromatiques, qui peuvent être résolus par ENDOR, permettant ainsi d'accéder à la densité de spin.⁷³ La technique ESEEM (*Electron Spin Echo Envelope Modulation*) peut aussi conduire à la connaissance des constantes de couplage hyperfin.

Le tenseur g est centré sur $g_e=2,0023$ (valeur de l'électron libre). La déviation par rapport à g_e est très faible pour les radicaux organiques (10^{-3}). g est sensible à l'environnement protéique global, i.e. la présence de dipôles électriques ou de liaisons hydrogène. Obtenir la mesure précise de la valeur de g par des mesures à haute fréquence (au-delà de 95 GHz) est nécessaire pour la comparaison avec les données de la littérature de différentes protéines, de systèmes modèles ou des calculs de DFT (*Density Functional Theory*), permettant ainsi l'identification de la nature chimique du radical. Les constantes de couplage hyperfin renseignent sur la délocalisation de la SOMO (*Singly Occupied Molecular Orbital*) et donc sur la densité de spin. Elles sont également sensibles à l'environnement local du centre paramagnétique.

Lorsque le spectre RPE est atypique ou très large, à cause de la proximité d'un centre métallique par exemple, il est difficile, même en s'appuyant sur des calculs théoriques, d'élucider la nature du résidu. L'approche par ENDOR peut alors aider à lever l'indétermination. Par exemple, la mesure par ENDOR des constantes de couplage hyperfin entre deux types de protons du radical organique observé pour la galactose oxydase correspond à un radical tyrosyle modifié en *ortho* par un substituant qui exhibe un couplage faible avec l'électron non apparié. Ceci, couplé à la connaissance de la structure RX de la protéine et à des expériences de marquage isotopique, a permis d'élucider la structure comme étant une tyrosine liée à une cystéine.⁷⁰

La détection des radicaux dépend de leur stabilité ; certains peuvent être détectés à température ambiante (c'est le cas du PSII) tandis que d'autres nécessiteront de très basses températures pour que l'on puisse mesurer un signal, furtif à température ambiante (catalases-péroxydases KatGs). L'intensité du signal RPE repose sur la distribution de Boltzmann : plus la différence entre la population de l'état excité avant et après irradiation sera grande, plus le signal observé en RPE sera intense. A 4 K, les spins sont tous à l'état fondamental. L'excitation micro-onde de l'échantillon va permettre le peuplement de l'état excité : le signal mesuré sera alors d'intensité maximale. A température ambiante, toujours selon la distribution de Boltzmann, le niveau excité sera déjà peuplé, induisant une plus faible amplitude voire une absence de signal.

Réalisée à des échelles de quelques millisecondes à quelques secondes, la technique de “freeze-quench” est utilisée pour déterminer si les intermédiaires observés sont bien les radicaux primaires intervenant dans la catalyse ou s’ils sont le résultat d’une réaction secondaire. Elle permet en outre d’observer les radicaux instables à température ambiante.

Cependant, si la réaction enzymatique implique plusieurs intermédiaires radicalaires, il est possible que leurs signaux se superposent sur le spectre de RPE. Jouer sur les paramètres de mesure du spectre, comme la température ou les temps de mélange, est une astuce qui supprime certains signaux. C’est le cas du radical tyrosyle de la RNR qui disparaît à 60 K à cause de la relaxation rapide du spin du radical liée à la proximité du cluster de fer. Cela permet donc d’éliminer une des trois composantes. Les deux autres radicaux impliqués sont à leur tour distingués sur des critères cinétiques en appliquant différents temps de mélange avant de bloquer la réaction par congélation.⁷⁴

La mesure des spectres à haut champ (285 GHz) est nécessaire pour une meilleure résolution du facteur g . Dans le cas de la catalase-peroxydase de *Synechocystis* PCC6803, Ivancich *et coll.*³⁹ montrent que la forme complexe du signal obtenu à bas champ ne peut pas être due à la présence d’une seule espèce radicalaire. L’obtention du spectre à haut champ confirme donc la présence, en plus du radical tyrosyle, d’un radical tryptophanyle. Cette technique spectroscopique permet également de déduire la nature de l’environnement du radical, au niveau notamment de la présence de liaisons hydrogène ou de charges à proximité du radical, par étude des valeurs de $g(g_x, g_y, g_z)$ et des couplages hyperfins.

II.2.2. Modifications chimiques ou biologiques de la protéine et analyse par spectroscopie RPE

II.2.2.a. Mutagenèse dirigée

Une fois le spectre RPE obtenu, il s’agit de regarder l’acide aminé par lequel lequel des candidats pressentis par la RPE est le plus à même d’être le siège de la réaction catalytique. Plusieurs techniques sont possibles : soit utiliser un acide aminé de même nature mais marqué avec les isotopes de l’hydrogène, du carbone ou de l’oxygène, soit modifier la nature de l’acide aminé par mutagenèse dirigée.

Le marquage isotopique engendre des modifications dans le spectre RPE (forme du signal) qui permet de manière directe d’obtenir la nature du résidu incriminé. Cette méthode a été décrite par Ivancich *et coll.*³⁹ sur la catalase-peroxydase native et mutante de *Synechocystis* PCC6803 en combinant RPE multifréquence et marquage isotopique sélectif. Des souches

modifiées d'*E. Coli* auxotrophe aux acides aminés soupçonnés par la RPE, i.e. tyrosine et tryptophane, sont utilisées. L'incorporation des acides aminés sélectivement deutérés dans la protéine s'effectue en les ajoutant au milieu de culture deutéré, pour éviter la dilution isotopique. Les modifications de la structure hyperfine obtenues sur le signal RPE à 9 GHz montrent que l'incorporation de l'acide aminé marqué a lieu sur le site où se trouve l'électron non apparié. Le doublet obtenu sur le spectre hydrogène, l'électron non apparié interagissant avec un noyau de spin $\frac{1}{2}$, se transforme sur le spectre deutérium (moment de spin $I = 1$) en un singulet plus fin. Le triplet que l'on devrait observer, avec des constantes de l'ordre de 2G, n'est pas résolu à cause de la largeur de raie du spectre et l'anisotropie du couplage.

La modification ainsi induite dans les spectres RPE des espèces radicalaires formées permet de déduire la nature chimique des résidus impliqués dans la catalyse. Les radicaux glycyle possédant eux un proton échangeable, le recours à la substitution isotopique par le ^{13}C fut nécessaire lors de l'étude du radical de la pyruvate formiate-lyase.⁷⁵

Remplacer un acide aminé par un autre judicieusement choisi doit normalement conduire à la perte du signal RPE en $g = 2$. En revanche, dans ce cas, il est possible qu'un autre acide aminé soit oxydé pendant le cycle catalytique et que, par conséquent, la mutation demeure silencieuse. Mesurer la vitesse de réaction du mutant et la comparer à l'enzyme native permet généralement de déjouer ce phénomène.

Pour la catalase-peroxydase *Synechocystis* PCC6803, la mutagenèse a permis de définir parmi plusieurs résidus tryptophane, pourtant proches dans l'espace, le site unique de formation de l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O ; Trp}^{\bullet+}]$ sur le Trp106.^{39,50}

La mutagenèse dirigée peut également entraîner une perte de l'activité enzymatique. Ainsi, la RNR mutée au résidu Tyr122 de la chaîne B2, portant au cours du cycle enzymatique le radical primordial au bon fonctionnement de l'enzyme, en un résidu phénylalanine n'exhibe plus aucune activité catalytique, permettant aux auteurs de conclure que c'est bien la tyrosine 122 qui est le site radicalaire de la RNR.⁷⁶

II.2.2.b. Utilisation de substrats enzymatiques particuliers

Des analogues de substrats conçus de sorte à augmenter la durée de vie du radical ou à en créer un nouveau, dont la structure peut être prédite, sont utilisés pour mettre en évidence un radical protéique au cours de la catalyse enzymatique. Par exemple, la RNR est inactivée par le substrat 2'-azoturo-2'-déoxyuridine 5'-diphosphate. Lors de la réaction avec ce substrat inhibiteur, le radical tyrosyle disparaît au profit d'un radical porté par un atome d'azote. Le

spectre RPE suggère la présence de l'entité XN^*SCH_2 . Les auteurs déduisent la présence d'un radical thiyle, lié covalamment à l'azote, par construction d'une souche d'*E. Coli* auxotrophe à la cystéine par incorporation spécifique de cystéine deutérée. La localisation se fait ensuite par mutagenèse dirigée.⁷⁷

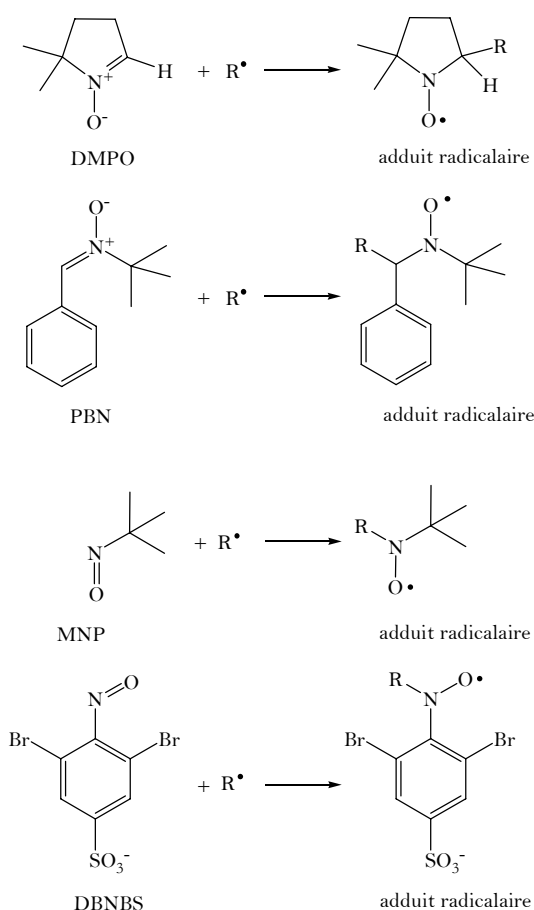
L'inconvénient de cette méthode est que, bien souvent, on ne détecte que le produit radicalaire le plus stable et non les intermédiaires. La simulation de spectres RPE à plusieurs fréquences avec des paramètres adéquats pour chacune des structures transitoires postulées peut alors aider à la compréhension du mécanisme et des intermédiaires. Ce fut le cas pour la cytochrome c peroxydase, pour laquelle la simulation a confirmé que le signal inhabituel du radical organique observé provenait du couplage entre le radical et le cofacteur métallique situé à proximité et a donc permis ainsi l'attribution du signal à un résidu spécifique.

II.2.2.c. Utilisation de molécules “*spin trap*”

L'utilisation de “*spin trap*” permet une détection indirecte du radical protéique. Les molécules dites “*spin trap*” sont essentiellement des molécules possédant une fonction nitrone ou nitroso, réagissant avec les radicaux primaires pour former un radical nitroxyde de durée de vie plus longue qui, lui, peut être détecté. Les molécules les plus couramment utilisées sont les nitrones *N*-oxyde de 5,5-diméthyl-1-pyrrolidine (DMPO), *N-tert*-butyl- α -phénylnitronne (PBN), les composés à fonction nitroso comme le 2-méthyl-2-nitrosopropane (MNP) et l'acide 3,5-dibromo-4-nitrosobenzène sulfonique (DBNBS). (Figure I-4).

Les molécules possédant une fonction nitroso ont pour avantage que le radical primaire s'additionne sur l'atome d'azote de la fonction NO, proche de l'électron non apparié, affichant une signature caractéristique en RPE. Cependant, l'utilisation de ces molécules n'est envisageable que pour les radicaux carbo-centrés.

Les composés pourvus d'une fonction nitrone permettent l'addition de radicaux portés par des hétéroatomes ; cependant, dans ce cas, le radical primaire s'additionne au carbone adjacent à l'azote, et est par conséquent plus éloigné de l'orbitale moléculaire renfermant l'électron célibataire. Le signal RPE résultant ne possède pas les couplages hyperfins renseignant sur la nature du radical primaire produit.

Figure I-4 : Molécules “*spin trap*” les plus couramment utilisées

La metmyoglobine forme également plusieurs radicaux protéiques tyrosyle et tryptophanyle lors de sa réaction avec le peroxyde d'hydrogène. L'utilisation de DMPO et de MNP couplée à la mutagenèse dirigée ont mis en évidence deux radicaux tyrosyle uniquement. Les radicaux tryptophanyle ont été piégés par le DNBBS.⁷⁸ Les adduits radicalaires sont ainsi analysés par RPE. Selon la forme du signal on peut déterminer la nature chimique du résidu radicalaire. Cependant, les agents “*spin trap*” ne sont pas forcément spécifiques des résidus piégés.

Il est souvent impossible de déterminer directement la localisation par RPE sur la protéine entière à cause du manque de résolution du spectre. On recourt alors à la protéolyse *via* une enzyme. Les peptides ainsi formés possèdent une plus grande mobilité, avec pour conséquence une meilleure résolution des couplages hyperfins du spectre RPE. Par comparaison avec des spectres d'adduits bien caractérisés, on peut déduire la localisation du radical sous réserve de connaître la séquence primaire du peptide concerné.⁷⁹ Cette méthode n'est applicable que pour les adduits ayant des durées de vie suffisamment longues pour permettre la digestion enzymatique. Une méthode de détection en ligne utilisant un système chromatographique couplé à de la RPE a été également utilisée pour détecter les adduits

formés par réaction du MNP avec le radical tyrosyle créé sur le cytochrome C lors de sa réaction avec le peroxyde d'hydrogène.⁸⁰

La technique de marquage de spin dirigé (Schéma I-8) consiste à muter les résidus choisis par des cystéines, puis à détecter les radicaux générés par ajout d'un agent "*spin trap*" de type nitroxyde spécifique des thiols. Une distance jusqu'à 20 Å entre deux centres paramagnétiques (radicaux organiques ou centre métallique) peut ensuite être mesurée.⁸¹ De plus, les radicaux thiyle sont difficiles à détecter en solution à cause du temps de relaxation du spin très court, le recours à la technique de "*spin trap*" est donc dans ce cas une méthode indispensable.

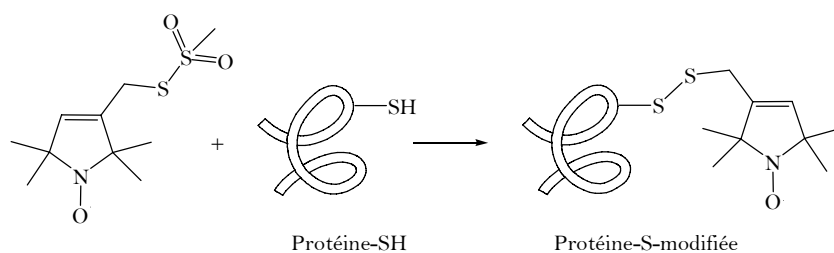


Schéma I-8 : Technique de marquage de spin dirigé

L'utilisation de "*spin trap*" possède plusieurs inconvénients, comme la non-détection de radicaux enfouis par défaut d'accessibilité, mais aussi les réactions parasites observées entre "*spin trap*" et résidu n'étant pas le site de formation du radical (Schéma I-9).

Les fonctions nitroso réagissent avec les résidus tryptophanyle pour donner des adduits de type hydroxylamine silencieux en RPE, mais qui peuvent ensuite être oxydés en nitroxydes paramagnétiques, qui eux sont détectables par spectroscopie RPE (Schéma I-9). Il a aussi été démontré que ces fonctions peuvent réagir avec des thiols libres pour donner également une hydroxylamine.⁸² L'utilisation d'agents "*spin trap*" marqués (²H, ¹⁵N) peut montrer l'étendue de ces artéfacts, par étude des modifications engendrées par la substitution isotopique sur le signal RPE.⁸³

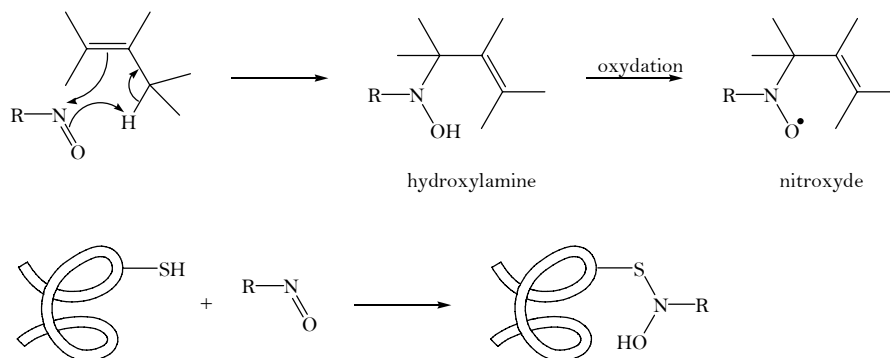


Schéma I-9 : réactions secondaires des molécules "*spin trap*"

II.2.2.d. Modification chimique des sites de formation des radicaux

Bloquer une position sur laquelle se forme normalement le radical est un outil relativement efficace et facile à mettre en œuvre. La majeure limitation est le manque de sélectivité des produits utilisés, qui réagissent avec une fonction donnée pouvant être portée par plusieurs acides aminés de nature différente. Cette méthode a été utilisée de manière intensive pour caractériser la présence de radicaux thiyle par alkylation des cystéines (blocage de la formation du radical sur le soufre). La comparaison des spectres RPE de la réaction du radical thiyle avec un “*spin trap*” et de celui obtenu après méthylation des cystéines confirme la plupart du temps si le radical formé est porté par un thiol.⁸⁴ Cependant, il est quand même nécessaire d'appliquer une autre technique pour déterminer la localisation du radical.

D'autres modifications chimiques sont également utilisées dans la littérature pour d'autres résidus comme la réaction avec le *N*-bromo-succinimide pour Trp,⁸⁵ l'iodation des résidus Tyr,⁸⁵ la réaction du diéthylpyrocarbonate avec His,⁸⁶ etc.

II.3. Méthodes liées à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est également un outil essentiel à la détection des adduits résultant d'une modification chimique des protéines par réaction d'un radical protéique avec un composé exogène à caractère radicalaire.

L'adduit formé par la réaction entre un agent “*spin trap*” et un radical protéique peut être directement visualisé par spectrométrie de masse sur la protéine entière. Par contre, l'adduit est souvent instable vis-à-vis des conditions de digestion de la protéine. Fenwick *et al.* ont eu recours à un agent réducteur, l'acide ascorbique, pour réduire l'adduit MNP-metmyoglobine, et pouvoir observer la localisation de l'adduit après digestion trypsique par spectrométrie de masse.⁸⁷ Cette technique permet la localisation et l'identification de tous les radicaux produits lors de la réaction, alors que la spectroscopie RPE ne permet pas l'entière attribution des espèces radicalaires.

Cette méthodologie reposant sur l'ajout d'espèces pro-radicalaires peut certes permettre l'investigation facile des radicaux formés, mais elle engendre beaucoup d'artéfacts, avec notamment la formation d'adduits non covalents qui compliquent l'analyse et l'interprétation des spectres de masse.⁸⁸

Plus récemment, une méthode appelée “*spin scavenging*” a été développée par la même équipe.⁸⁹ Ici, des substances radicalaires pouvant réagir par recombinaison avec le radical formé sur la protéine sont utilisées, donnant ainsi naissance à un adduit stable. Le radical

utilisé est majoritairement du TEMPO (2,2,6,6-tétraméthylpipéridinyl-1-oxyde), Figure I-5, ou un de ses analogues. De même, après réaction, la protéine est digérée et les fragments issus de la protéolyse sont analysés par spectrométrie de masse.

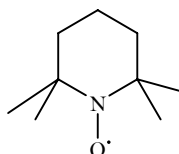


Figure I-5 : structure du TEMPO

Les avantages de cette technique par rapport à l'utilisation de "*spin trap*" couplée à la RPE sont multiples. L'interprétation des données est beaucoup plus simple et ne conduit pas à des erreurs dues à une mauvaise attribution des signaux de RPE. De plus, les produits d'addition de type TEMPO-peptide sont stables dans les conditions d'expériences, ce qui élimine une source notable d'erreurs et d'artéfacts. Cependant, si un adduit avec le radical nitroxyde se forme via l'hétéroatome du résidu oxydé, il risque de ne pas être stable lors de la digestion. Cette méthode semble donc ne pouvoir être utilisée que lors de la formation de radicaux carbocentrés. De plus, elle ne permet pas de piéger les radicaux de courte durée de vie.

L'analyse des radicaux glycyle est relativement simple puisque ce radical est détruit par l'oxygène. Il suffit donc d'apporter de l'oxygène dans le milieu après formation du radical. Deux fragments peptidiques sont produits et leur analyse par spectrométrie de masse après protéolyse permet la localisation du radical sur la glycine.⁷⁵

II.4. Méthodes liées à la RMN

Cette méthode consiste à regarder les produits stables obtenus par réaction entre espèces radicalaires et molécules de type "*spin trap*".⁹⁰ Cette technique reste limitée à cause du manque de sensibilité et de la difficulté à isoler chacune des résonances des produits issus du "*spin trap*" en raison du nombre important de signaux. Cependant, elle a tout de même permis d'examiner la formation du radical formé sur la myoglobine par utilisation de MNP-¹³C. Bose-Basu *et al.* ont déterminé par RMN à deux dimensions quels étaient les noyaux voisins, donc de déterminer à quelle position du résidu (Tyr103) l'étiquette était attachée.⁹¹

II.5. Utilisation d'anticorps contre des agents "*spin-trap*"

La présence et la localisation de radicaux formés sur les protéines peuvent également être détectées par des techniques immunologiques. Elles consistent à utiliser des anticorps

polyclonaux reconnaissant des antigènes possédant des caractéristiques structurales communes avec des adduits formés entre l'agent "*spin trap*" et les radicaux protéiques. Cette approche ne fait pas appel à la spectroscopie RPE pour analyser les adduits formés, mais à la technique de Western-Blot couplée ou non avec un test ELISA pour visualiser les complexes antigènes-anticorps. Ainsi, les radicaux formés sur la myoglobine⁹² et sur l'hémoglobine⁹³ ont été détectés de manière immunologique par visualisation de l'adduit tyrosine-DMPO.

Malgré ses grandes spécificité et sensibilité, la détection immunologique requiert d'une part l'obtention d'anticorps dirigés contre les adduits "*spin trap*"-résidu protéique et d'autre part une technique expérimentale autre pour mettre en évidence la nature du résidu portant le radical (comme la modification chimique par exemple). De plus, elle ne s'affranchit pas non plus des réactions secondaires non spécifiques du radical primaire généré (Schéma I-9, p. 34).

II.6. Contrôle de l'activité

Pour la prostaglandine H-synthase, la modification chimique avec du tétranitrométhane, ou la mutation spécifique des résidus tyrosine par des phénylalanines, ont confirmé la perte de l'activité cyclooxygénase couplée à la perte du signal caractéristique du radical organique en RPE et ont permis de déterminer quel résidu était impliqué dans la catalyse.⁹⁴⁻⁹⁶

II.7. Expériences de simulation

Il existe des méthodes de modélisation permettant de simuler les spectres RPE de radicaux protéiques, seuls³⁴ ou en présence de "*spin traps*".^{97,98} Elles tiennent compte généralement des valeurs de g et quelquefois des valeurs des constantes de couplage hyperfin. Ces approches aident à identifier la nature chimique du radical et peuvent renseigner sur sa localisation. La méthode avec les "*spin traps*" renseigne sur quels atomes peuvent se former les adduits de nitrones, mais il est clair que la technique est limitée à de petites protéines et à des sites uniques de formation des radicaux.³⁶

L'utilisation de modèles mathématiques permet également de comparer les données expérimentales et calculées de différents intermédiaires réactionnels probables et de discriminer parmi eux quel est le meilleur candidat à l'oxydation.

Ainsi pour la galactose oxydase, il est possible de montrer *in silico* que l'intermédiaire intervenant dans le cycle catalytique possède les mêmes caractéristiques spectroscopiques que le radical (méthylthio)crésyle, au détriment des radicaux phénoxy et (méthylthio)phénoxy.

L'étude permet de constater la grande similarité entre les données expérimentales comme les constantes de couplage hyperfin des radicaux potentiellement impliqués, les fréquences vibrationnelles Raman, corroborant ainsi la structure du radical observé pour cette enzyme.

II.8. Méthodes de “footprinting”

Ces méthodes reposent sur les différences d'accessibilité au solvant des résidus acides aminés d'une protéine. Le concept de cette approche est d'effectuer une cartographie des résidus situés à la surface d'une protéine *via* leur modification chimique par une multitude de méthodes impliquant l'oxydation, l'ajout d'étiquettes, le marquage isotopique. Les transformations sont souvent induites par le radical hydroxyle. Elles sont en général développées pour étudier la structure, les changements conformationnels, ainsi que les zones d'interaction de macromolécules par comparaison des modifications obtenues sur la surface des protéines soit séparément, soit en interaction.⁹⁹

Le principe de ces méthodes peut aider à comprendre les mécanismes impliqués et les produits d'oxydation obtenus dans le cas de l'attaque aléatoire de radicaux lors d'un stress oxydant. Dans la littérature, il existe trois méthodes principales déterminant la localisation des radicaux générés par l'attaque des radicaux hydroxyle sur les acides aminés, les peptides et les protéines (Schéma I-10).

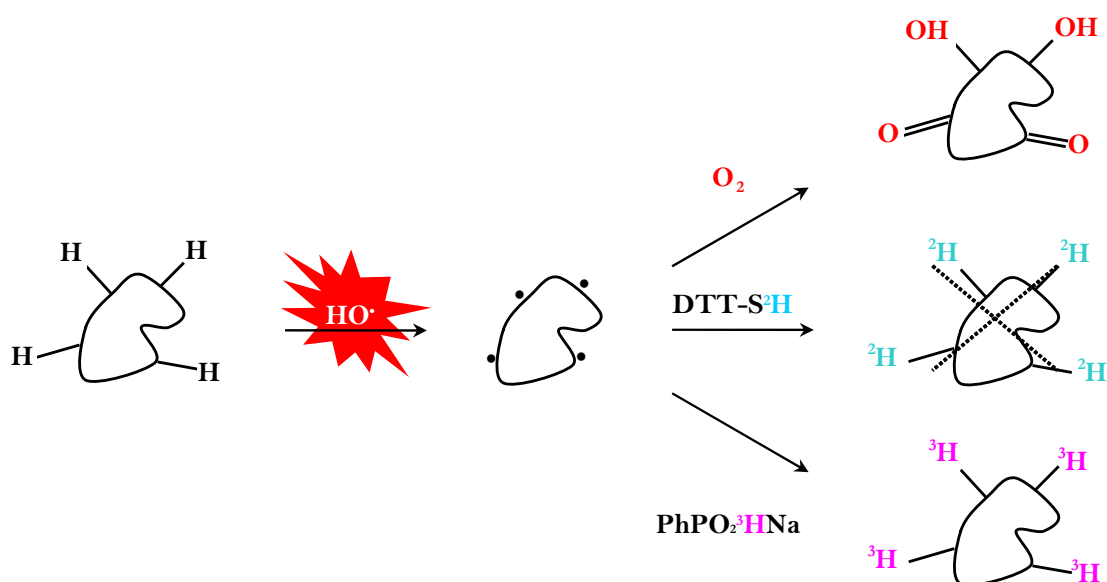


Schéma I-10 : Représentation de la formation de radicaux sur une protéine puis piégeage par le dioxygène ou des isotopes de l'hydrogène

II.8.1. Oxydation

La méthode développée par Chance (Schéma I-10, voie O₂) consiste à étudier la réaction des acides aminés naturels avec les radicaux hydroxyle en milieu aérobie et à étudier les produits d'oxydation par spectrométrie de masse.¹⁰⁰ Quatorze des vingt acides aminés sont détectables par cette méthode. En particulier, il a montré pour la tyrosine qu'une partie de l'oxygène incorporé lors de son oxydation provient de l'eau en plus du dioxygène dissous par l'utilisation de H₂¹⁸O. Par extension, cette méthode permet de cartographier la surface des protéines ainsi que de définir l'assemblage de complexe et les changements de conformations de protéines.¹⁰¹ Après attaque des radicaux hydroxyle sur les chaînes latérales des acides aminés d'une protéine, une protéolyse enzymatique permet de la cliver en peptides, qui sont ensuite purifiés, identifiés et quantifiés par LC-MS. Les résidus oxydés sont mis en évidence par spectrométrie de masse en tandem.

II.8.2. Echange ¹H/²H

L'approche d'Anderson (Schéma I-10, voie DTT, p. 38) étudie la réparation des acides aminés en milieu désoxygéné après réaction avec HO• par un réducteur, le dithiothreitol-*d*₄ (DTT-*d*₄, E = -0,33 V à pH 7¹⁰¹).¹⁰²⁻¹⁰⁴ Celui-ci est entièrement deutéré sur ses positions échangeables afin d'introduire un isotope stable sur les chaînes latérales des acides aminés par réaction avec un radical carbocentré.

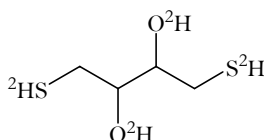
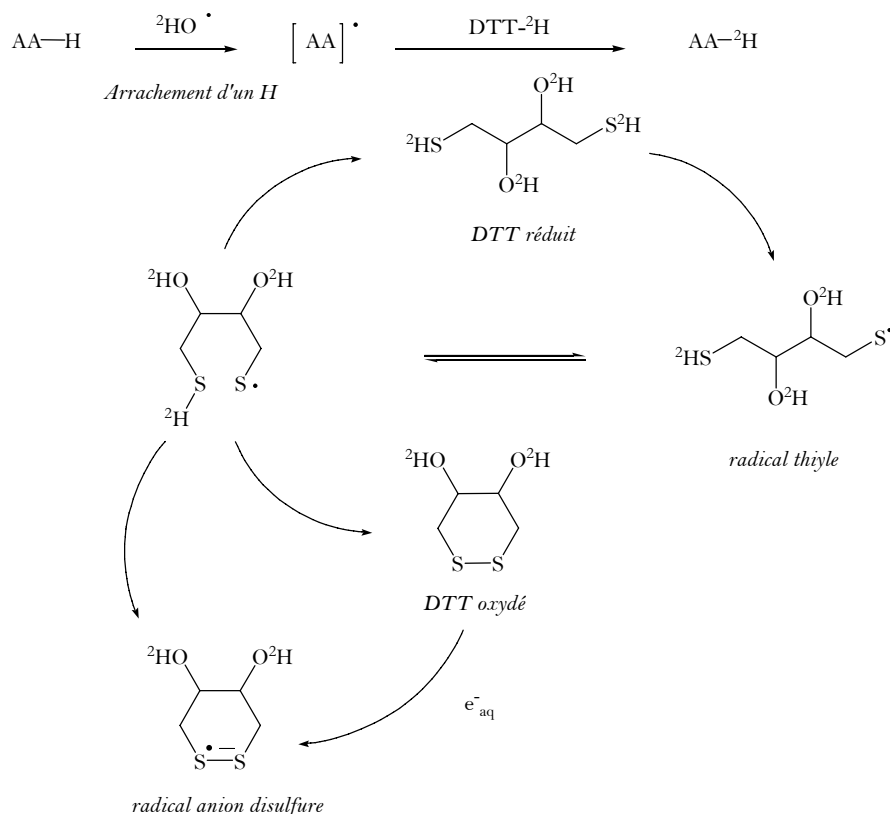


Figure I-6 : formule du DTT deutéré

Ce thiol permet de mimer l'action du glutathion *in vivo*. Les liaisons S-²H étant labiles, les réactions se font dans de l'eau deutérée très hautement enrichie.

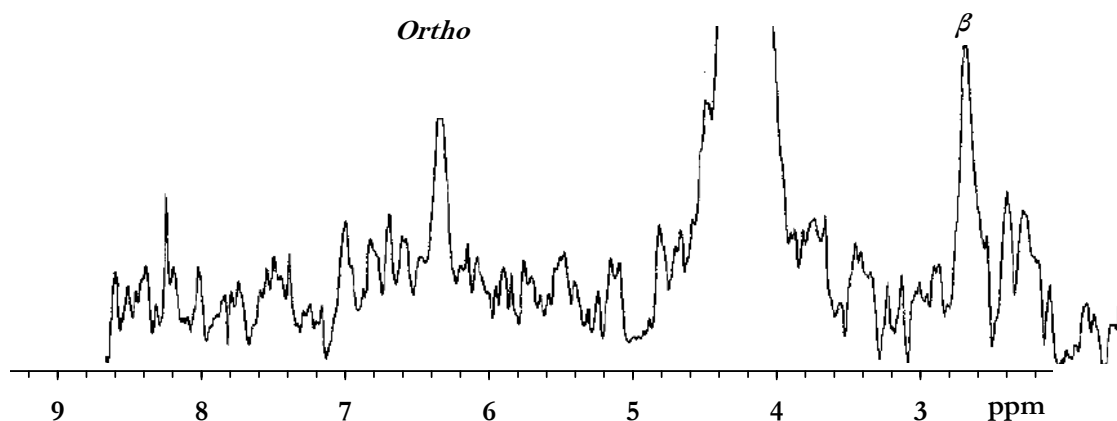
Le Schéma I-11 décrit la méthode de marquage ainsi que le devenir du DTT. Après attaque des HO• sur les acides aminés, le DTT incorpore un atome de deutérium sur les radicaux carbocentrés, formant un radical thiyle. Par recombinaison de deux molécules de ce radical, le DTT réduit est régénéré et il se forme une molécule de DTT oxydé.¹⁰⁵ D'autre part, le radical thiyle peut se recombiner de manière intramoléculaire en anion disulfure cyclique stabilisé.

Schéma I-11 méthode d'échange ${}^1\text{H}/{}^2\text{H}$ et devenir du DTT

Les acides aminés ainsi modifiés sont analysés par spectrométrie de masse pour déterminer la quantité de deutérium incorporée et par RMN ${}^2\text{H}$ permettant de connaître la régiosélectivité de l'attaque. Cette méthodologie a permis d'évaluer les sites les plus sensibles à l'attaque des HO^\bullet , formant des radicaux carbocentrés par arrachage d'un hydrogène, et d'évaluer la réactivité relative de chacun des acides aminés. L'échelle obtenue est la suivante :

Leu>Ile>Val>Arg>Lys>Tyr>Pro>His>Phe>Met>Thr>Ala>[Glu,Ser,Asp,Gln,Trp,Asn,Gly, Cys]

En particulier, la tyrosine est relativement bien marquée, et, dans ce cas, ce sont les positions méthylènes qui démontrent la plus forte incorporation ; cependant, on observe également l'incorporation d'atomes de deutérium en *ortho* de la fonction phénol (Figure I-7).

Figure I-7 : spectre RMN ${}^2\text{H}$ de la tyrosine irradiée en présence de DTT, référence 104

Ces résultats montrent que le mécanisme passe par la formation du radical phénoxyyle stabilisé par résonance en positions *ortho* et *para*. L'incorporation de deutérium suivie de la réaromatisation du cycle conduit à l'incorporation préférentielle de ^2H due à un effet cinétique primaire (Schéma I-12).

L'incorporation sur la position β s'explique par la formation d'un intermédiaire pseudo-quinone possédant un groupement méthylène en *para*. La réduction ultime de la double liaison externe conduit à l'incorporation de deutérium en position β .

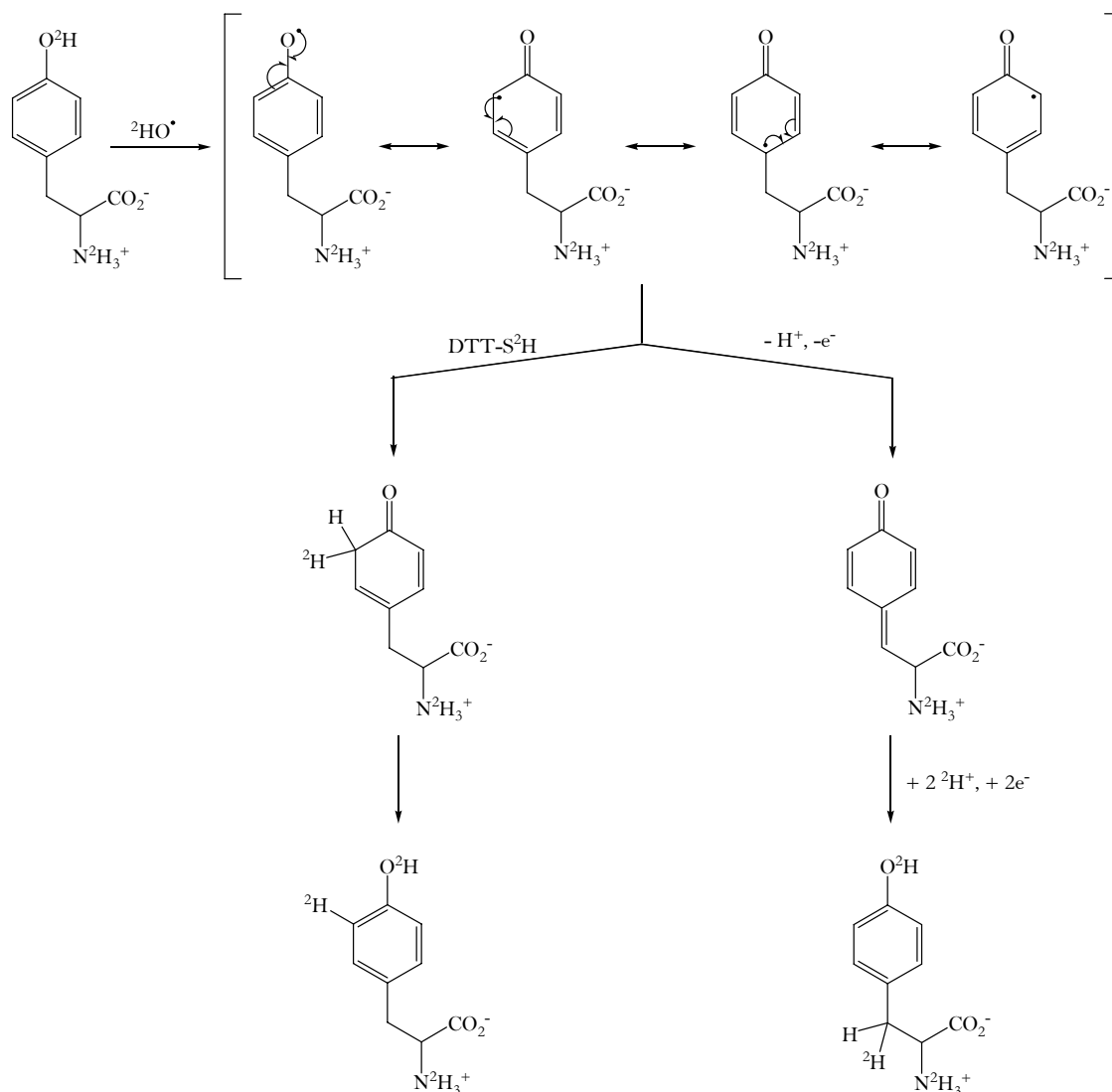


Schéma I-12 : mécanisme proposé pour l'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ sur la tyrosine induit par les radicaux hydroxyle et le DTT (Nukuna *et al.*, référence 104)

Cependant, seulement douze des vingt acides aminés voient leur incorporation en deutérium suffisamment importante pour pouvoir être significative. Le concept a même été étendu à l'étude de peptides. En revanche, elle ne semble pas applicable à l'investigation de protéines, en raison de la trop faible incorporation en deutérium et de la faible sensibilité du deutérium, vis-à-vis de la RMN notamment.

II.8.3. Echange $^1\text{H}/^3\text{H}$

Au laboratoire a été développée une méthode de marquage au tritium analogue à la méthode d'Anderson. Cependant, on substitue au deutérium le tritium, beaucoup plus facilement détectable et quantifiable, afin de pouvoir cartographier l'enveloppe de protéines (Schéma I-10, voie $\text{PhPO}_2^3\text{HNa}$, p. 38). On peut ainsi recourir à la mesure par scintillation liquide (détection minimale de 5 à 10 Bq, soit 5-10 fmol de ^3H) et par RMN ^3H . La grandeur mesurée est l'activité spécifique§ de chacun des acides aminés.¹⁰⁶

L'approche par le DTT deutéré n'est pas transposable au tritium puisqu'il faudrait utiliser de l'eau tritiée de très haute activité spécifique, ce qui est difficile expérimentalement. Les caractéristiques du composé susceptible de pouvoir donner un atome d'hydrogène (composés réducteurs de type X-H) par voie radicalaire est le suivant :

- Hydrosoluble
- Liaison X-H non labile à pH physiologique
- Synthèse facilement transposable au tritium, avec de préférence incorporation de l'isotope en dernière étape
- Vitesse de réaction avec les radicaux carbocentrés adaptée : la vitesse de transfert de l'atome d'hydrogène doit être proche de celle de réaction des radicaux hydroxyle, ce qui correspond à une force de liaison X-H relativement faible (radical associé peu réactif).

Après recherche dans la littérature de telles molécules,** le sel sodique de l'acide phénylphosphinique s'est révélé être un bon candidat.

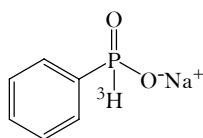


Figure I-8 : formule du sel sodique de l'acide phénylphosphinique

L'incorporation en tritium a été déterminée pour chacun des vingt acides aminés naturels, afin de déterminer l'échelle de réactivité du système radicaux hydroxyle/composé phosphoré. La méthode est puissante puisqu'elle permet d'obtenir une information sur dix huit des vingt acides aminés, avec comme ordre :

Lys>Leu>Arg>Ile>Trp>Phe>Val>Cys>Met>His>Tyr>Glu>Thr>Asp>Gln>Pro>Ala>Asn>

§ Activité spécifique (Bq.nmol^{-1}): nombre de désintégrations par seconde (Bq) et par mole d'un composé marqué

** La discussion sur les molécules potentiellement utilisables décrites dans la littérature sera effectuée au chapitre III.

[Ser,Gly].

Ce sont les acides aminés aliphatiques, chargés positivement, soufrés et aromatiques qui sont les plus sensibles vis-à-vis de la réaction avec les radicaux hydroxyle, confirmant les données de la littérature.⁶⁵

Après vérification de l'applicabilité à des peptides et à une protéine (corrélation entre structure tertiaire et intégration en tritium), la méthode a ensuite été utilisée pour la détermination de la zone d'interaction entre la protéine Asf1 et le chaperon d'histone H3.¹⁰⁷

III. Caractéristiques du couple tyrosine/radical tyrosyle

L'étude du radical tyrosyle formé dans les protéines requiert la connaissance des grandeurs physico-chimiques qui lui sont associées, comme le potentiel rédox, l'état de charge, la densité de spin, etc. Pour comprendre et interpréter les données obtenues expérimentalement, il est nécessaire de caractériser en premier lieu le radical tyrosyle libre, en solution ou à l'état cristallin, pour mieux appréhender la transposition à la protéine.

III.1. Formation du radical en solution

La formation du radical (de manière active) dans les protéines a été étudiée dans la partie I. Plusieurs systèmes sont possibles pour générer le radical tyrosyle en solution.

Le système enzymatique le plus classique oxydant la tyrosine en radical tyrosyle est celui utilisant la peroxydase de raifort (*Horseradish Peroxidase*, HRP) et le peroxyde d'hydrogène (Schéma I-13).⁸⁹

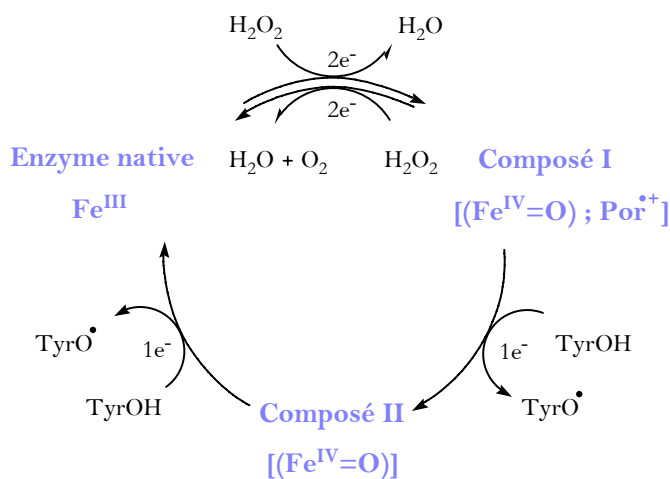


Schéma I-13 : mécanisme de l'oxydation de la tyrosine par les composés I et II

H_2O_2 oxyde Fe(III) en composé I qui a son tour oxyde la tyrosine en solution en radical tyrosyle. Le composé II formé de manière concomitante peut lui aussi oxyder une deuxième molécule de tyrosine et continuer ainsi le cycle.

La cinétique à 25°C de l'oxydation de la tyrosine en radical tyrosyle par ce système a été décrite par Ralston et Dunford^{108,109} et comparée avec celles d'autres peroxydases comme la myéloperoxydase, la lactoperoxydase, la thyroïde peroxydase, par Marquez *et al.*¹¹⁰. Les constantes de vitesse de la réduction par la tyrosine du composé I en composé II et du composé II en Fe^{III} sont respectivement $5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La tyrosine est mise en excès par rapport à l'enzyme, elle-même en excès par rapport à H_2O_2 .

Les produits secondaires sur ce système sont multiples : il y a formation de dityrosine, par recombinaison du radical tyrosyle, mais également des pontages entre macromolécule et tyrosine ou entre deux macromolécules formant des dimères de protéines.

Les radicaux tyrosyle peuvent être également générés par irradiation UV (laser à 266 nm, lampe à vapeur de mercure) d'une solution dégazée de tyrosine à un pH tel que le phénol soit déprotoné ($\text{pK}_a = 10,1$), le plus souvent dans la soude¹¹¹ ou dans un tampon borate,¹⁸ dans des solutions congelées ou décongelées. De la 3-iodotyrosine dans HCl a également été irradiée pour former des radicaux tyrosyle par irradiation avec une lampe à vapeur de mercure.⁸⁰ Le produit final le plus observé est la α,α' -dityrosine.

D'autres méthodes de formation du radical tyrosyle existent, comme l'oxydation en milieu basique *via* KMnO_4 , l'oxydation par des métaux comme les complexes au ruthénium⁺⁺¹¹² ou encore la radiolyse de solutions aqueuses de tyrosine (traitée au chapitre IV).¹¹³

En première approche, l'oxydation à un électron du phénolate conduit tout d'abord à la formation du radical sur l'oxygène, ensuite délocalisé sur l'ensemble du cycle par mésomérie (Schéma I-14).

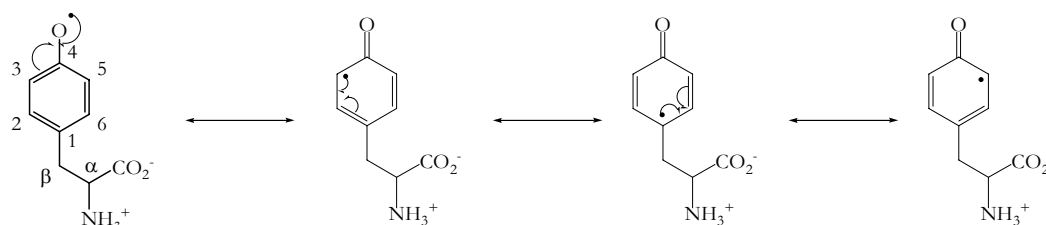


Schéma I-14 : formes mésomères classiques du radical tyrosyle

⁺⁺ Réaction de formation du radical tyrosyle par $\text{Ru}^{\text{III}}\text{-TyrOH} \rightarrow \text{Ru}^{\text{II}}\text{-TyrO}^\bullet + \text{H}^+$, permettant aussi d'étudier les mécanismes de transfert de proton et d'électron.

III.2. Données thermodynamiques

Sjödén *et coll.* ont estimé le potentiel standard rédox du couple $[\text{TyrOH}]^{\bullet+}/\text{TyrOH}$ à 1,44 V (Schéma I-15).¹¹⁴ Cette valeur correspond aux valeurs du potentiel à pH 7 trouvées par électrochimie et radiolyse de 0,93 V *via* la formule de Nernst (Tableau I-1).¹¹⁵ Le potentiel rédox de la tyrosine décroît de manière linéaire de 59 mV par unité de pH jusqu'à $\text{pH}=\text{pK}_{\text{a}}(\text{phénol})$, puis est constant et égal à 0,72 V (Figure I-9).¹¹⁶

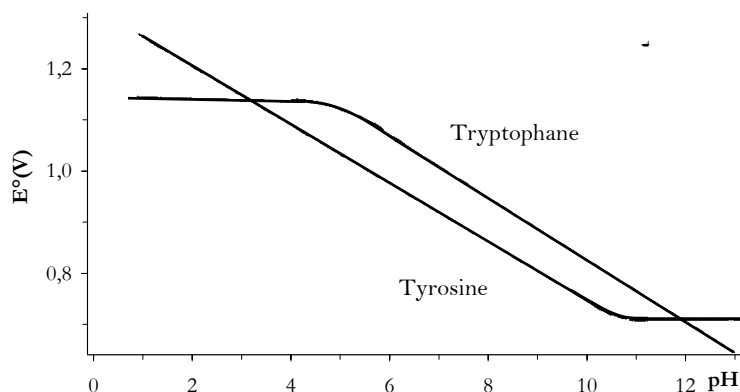


Figure I-9: potentiel rédox de la tyrosine mesuré en fonction du pH (d'après Harriman, référence 116)

$E_{\text{Tyr}}(\text{V})$ vs ENH		
pH 2	pH 7	pH 13
1,22	0,93	0,72

Tableau I-1 : potentiel rédox de la tyrosine mesuré en fonction du pH (voltampérométrie cyclique)

Le pK_{a} du radical cation de la tyrosine est estimé à -2 (Schéma I-15).¹¹⁷

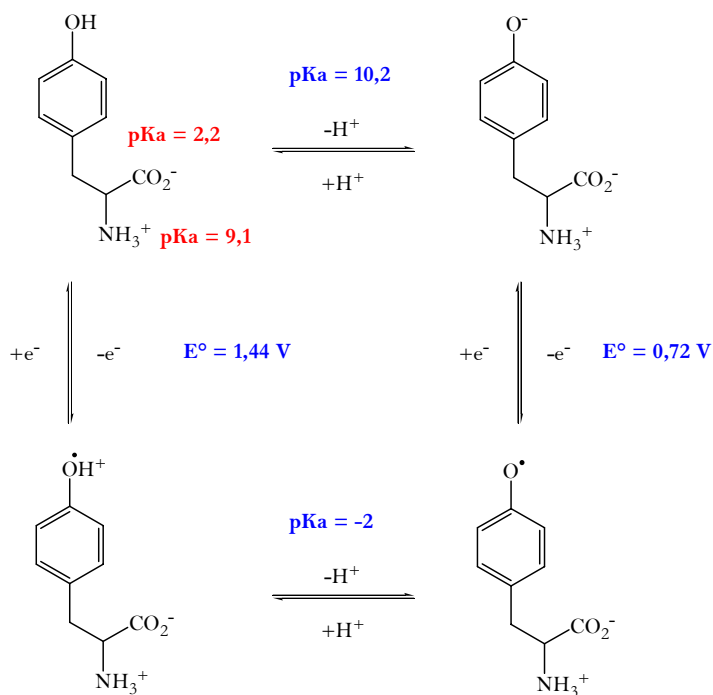


Schéma I-15 : valeurs thermodynamiques du couple tyrosine- radical tyrosyle

Le radical tyrosyle est donc déprotoné en milieu aqueux à pH physiologique. La différence entre les deux pK_a explique la chute du potentiel standard rédox du couple $TyrO^\bullet/TyrO^-$.

L'environnement de la protéine confère à l'acide aminé des propriétés rédox très différentes de celles en solution. Les données concernant ces potentiels sont encore rares, car souvent difficiles à déterminer ; on ne sait généralement pas quelle est leur variation en fonction du pH ou à l'environnement protéique (Tableau I-2).¹¹⁸

Dans le PSII, les potentiels de réduction des deux radicaux Tyr_D^\bullet et Tyr_Z^\bullet (cf. I.1.2) varient entre 0,75 V et 1,0 V. Le potentiel rédox apparent du radical tyrosyle de la RNR de classe I est estimé à 1,0 V. Il a été déterminé par l'utilisation de différents réducteurs du cluster. Une autre conclusion a pu être tirée de ces résultats : l'incapacité du radical tyrosyle à réagir avec certaines molécules a montré que le radical se trouve dans une poche hydrophobe. Cela montre la difficulté de mettre en œuvre la détermination des potentiels rédox, puisque dans certains cas, on ne pourra distinguer que les réactions parasites (oxydation de l'eau, etc.).¹¹⁹

Pour la galactose oxydase (GAO), le potentiel de la tyrosine est estimé à 0,4 V, soit 0,6 V de moins que le potentiel mesuré pour le radical tyrosyle dans des peptides modèles.⁴

En plus des potentiels rédox des différents intermédiaires, les données électrochimiques permettent également d'accéder à des informations sur le cofacteur métallique selon le substrat utilisé (sélectivité), les effets allostériques, etc.¹²⁰

Entrée	Système	E (V) vs ENH
1	Tyr^\bullet libre	0,93
2	Tyr_Z^\bullet	1,00
3	Tyr_D^\bullet	0,72-0,76
4	Tyr^\bullet RNR	1,00
5	Tyr^\bullet GAO	0,42

Tableau I-2 : Récapitulatif des potentiels rédox des radicaux tyrosyle de différents systèmes enzymatiques à pH physiologique

III.3. Détermination de la densité de spin

III.3.1. En solution

Les spectres RPE du radical tyrosyle généré par réaction enzymatique ou oxydation chimique sont mesurés à température ambiante que l'on utilise ou non un agent "*spin-trap*".¹²¹

En revanche, si le radical est produit par photochimie, on utilise des solutions congelées qui sont ensuite irradiées, puisque le temps de vie du radical tyrosyle formé par illumination UV à température ambiante est de 77 μ s à pH 10.¹²² Le maximum d'absorption du radical est à 400 nm. A 77 K, le radical est stable.

La mesure des spectres RPE au delà de 60°C a permis la totale caractérisation du radical en s'affranchissant des contraintes rotationnelles, montrant que les deux protons du groupement méthylène sont magnétiquement non équivalents.

Le spectre du radical tyrosyle obtenu par oxydation par le composé I de la HRP est identique à celui obtenu par oxydation avec KMnO_4 et par simulation.¹²¹ La forme du signal résulte des couplages hyperfins de l'électron célibataire avec les protons du cycle et avec les protons β du groupe méthylène et dépend également de l'angle dièdre θ ($\text{C}_2\text{-C}_1\text{-C}_\beta\text{-H}$).

Hulsebosch *et coll.* ont calculé les densités de spin électroniques du radical tyrosyle à partir des constantes de couplages hyperfins obtenues expérimentalement par détermination des spectres RPE du radical tyrosyle spécifiquement marqué ^2H , ^{13}C et ^{17}O entre les noyaux de moment magnétique non nul et le radical π .¹¹¹

Les spectres en solution congelée permettent de résoudre partiellement la structure hyperfine. Ce sont eux qui sont utilisés pour calculer les densités de spin, en mesurant les interactions hyperfines de l'électron non apparié avec un noyau de moment de spin non nul (Figure I-10).

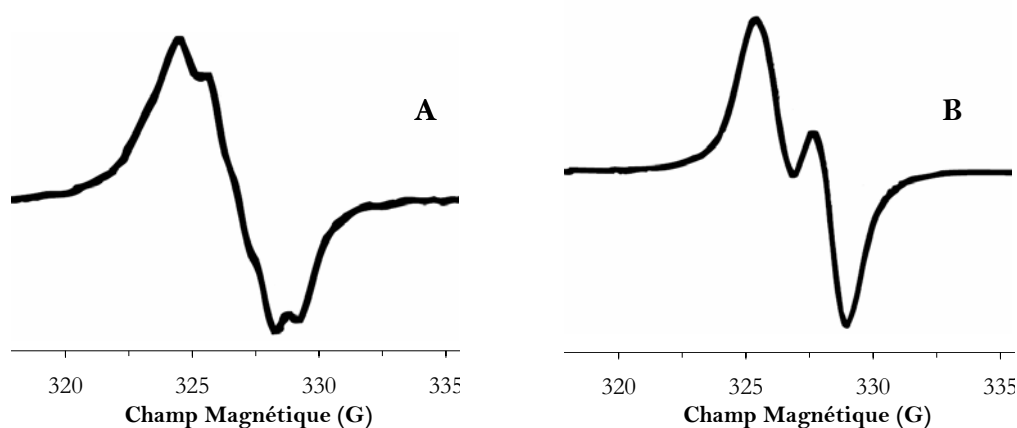


Figure I-10 : spectres RPE (9 GHz) du radical tyrosyle formé par irradiation en milieu basique (solution congelée). A : Tyr entièrement hydrogénée. B : 3,5- ^2H -Tyr. tiré de Hulsebosch *et al.*, référence 111

Les interactions hyperfines des protons tiennent compte à la fois d'un terme isotrope proportionnel à la densité de spin électronique sur le noyau considéré (interaction de contact, contact de Fermi) et à un terme anisotrope dû au couplage dipolaire entre noyau et électron, visible dans un solide ou dans une solution gelée.

La relation dite de McConnell liant la constante de couplage hyperfin $A_C^{H\alpha}$ pour un proton α lié à un radical π et la densité de spin ρ_C^π de l'électron π non apparié sur un carbone adjacent hybridé sp^2 est donnée par la relation: $A_C^{H\alpha} = Q_{CH}^H \rho_C^\pi$, avec Q_{CH}^H : constante de proportionnalité relative au proton $H\alpha$ lié au carbone C portant l'électron (interaction π - σ), déterminée de manière empirique comme étant comprise entre -2 et -3 mT.

Pour les protons β , le tenseur hyperfin est, dans ce cas, donné par $A_C^{H\beta} \approx B_1 \rho_{C_1}^\pi \cos^2 \theta$, avec B_1 terme constant relatif égal à 5,8 mT.

Des relations similaires lient les constantes de couplage d'autres noyaux (2H , ^{17}O , etc) aux densités de spin de ces noyaux.

La densité totale de spin sur le cycle aromatique et l'oxygène phénolique est proche de 1 (Figure I-11). On observe bien que les densités électroniques prédites par la théorie de Mülliken sont respectées, i.e. que les densités en *ortho* et *para* sont bien plus importantes qu'en *ipso* et *méta*, donc que le radical peut être porté par des carbones cycliques. Cette délocalisation se déduit du spectre RPE par la détermination des couplages hyperfins entre le radical et les protons du cycle et du C_β . Les densités de spin sont caractéristiques d'une espèce déprotonée, ce qui concorde avec la valeur négative de pKa du couple Tyr- $O^\bullet(H^+)/$ Tyr- O^\bullet .

Quelles que soient les méthodes utilisées pour former les radicaux tyrosyle (oxydation chimique de tyrosine en solution, irradiation UV d'un cristal) et la température à laquelle le spectre RPE est mesuré, il apparaît que la densité de spin observée sur le radical tyrosyle est délocalisée sur le cycle aromatique et sur l'oxygène de la fonction phénol.⁷

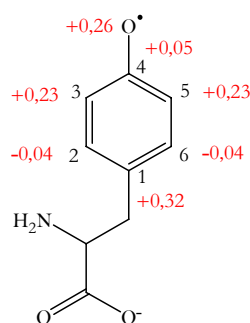


Figure I-11 : densités de spin sur le radical tyrosyle

De plus, des études de Raman ont montré une augmentation dans la fréquence d'élongation de la liaison C-O correspondant à la délocalisation sur l'oxygène.

Les modifications observées dans les spectres en fonction du pH sont mineures : les quelques différences dans les interactions hyperfines des protons H_β observées semblent

provenir de l'état de protonation différent des groupes amine ($pK_a = 9,1$) et carboxylique ($pK_a = 2,2$). Aucun changement qualitatif n'apparaît lorsque l'on balaie la gamme de pH basique entre 8 et 13. Le spectre RPE de solution de tyrosine à pH 2 (H_2SO_4) a également été enregistré et ressemble fortement à celui obtenu pour la solution basique.

Des études ont également été menées sur des systèmes peptidiques simples en solution afin de modéliser le comportement du radical dans les protéines.¹²³ Ceci a été réalisé pour déterminer l'effet des charges, la délocalisation à d'autres résidus du radical, la vitesse de transfert de l'électron, etc. Des pentapeptides de structures identiques aux séquences trouvées dans les enzymes utilisant des tyrosines comme cofacteur protéique (RNR et PSII) ont été irradiés, et le spectre RPE résultant fut comparé à celui du radical tyrosyle libre obtenu dans les mêmes conditions d'irradiation. La forme du signal RPE montre qu'elle dépend de la séquence en acides aminés du peptide *via* les différences de conformations adoptées par le radical tyrosyle et de l'état de charge. De plus, l'oxydation de la tyrosine perturbe la structure électronique de la liaison peptidique par délocalisation de la densité de spin sur le groupe amide de la liaison peptidique. Des calculs de DFT sur le radical tyrosyle soutiennent cette hypothèse, montrant que la densité de spin se délocalise jusque sur les fonctions amine et acide carboxylique de la tyrosine.¹²⁴

III.3.2. Dans les protéines

Dans les protéines, l'environnement du radical tyrosyle formé, comme les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène, la nature hydrophobe des résidus alentours, modifie considérablement ses caractéristiques comme son potentiel rédox et sa stabilité. Par exemple, la stabilité des radicaux tyrosyle observés dans le PSII ou la RNR est bien différente de celle en solution, puisque ces radicaux peuvent persister respectivement de quelques heures à quelques jours.

La détermination de la distribution des densités de spin pour différents radicaux protéiques a fait l'objet d'un grand nombre de publications, notamment dans les années 1990, à l'aide des spectroscopies RPE, de l'ENDOR et de l'ESEEM. Une fois les valeurs des couplages hyperfins obtenues, un traitement mathématique est nécessaire pour obtenir la distribution des densités de spin correspondante.¹²⁵

Tommos *et coll.* ont étudié le radical Tyrz[•] du PSII et, d'après la détermination des tenseurs de couplages hyperfins ont déduit les valeurs décrites dans le Tableau I-3.¹²⁶ Le radical TyrD[•] a également été étudié,^{127,128} ainsi que le radical tyrosyle de la RNR.¹²⁹ Des études de marquage avec ^{17}O permettent de définir la densité de spin sur l'oxygène, donc de

répartir entre l'oxygène et C₄ la densité de spin totale calculée sur la molécule non marquée.

Entrée	Tyr•	C ₁	C _{2,6}	C _{3,5}	C ₄	O	C _β
1	Y libre	0,32	-0,04	0,23	0,05	0,26	-
2	Y _Z	0,37	-0,06	0,25	-0,01	0,26	-
3	Y _D	0,40 ¹²⁷ 0,37 ¹²⁸	-0,07 & -0,08 ¹²⁷ -0,06 ¹²⁸	0,26 & 0,27 ¹²⁷ 0,25 ¹²⁸	-0,03 ¹³⁰	0,25 ¹³⁰	0,01
4	Y RNR	0,38	-0,08	0,25	-0,05	0,29	0,03

Tableau I-3 : distribution des densités de spin sur les différents atomes de la tyrosine, pour les radicaux tyrosyle de la RNR et du PSII

Ces valeurs varient peu selon que le radical soit impliqué dans des liaisons hydrogène ou non. La différence a été calculée pour Tyr_D• comme étant de 0,01.¹³⁰

Enfin, la délocalisation sur la liaison peptidique a également été observée chez les enzymes du PSII (cf. référence 131 et références internes).

De plus, le radical de l'allène oxyde synthase du corail possède les mêmes caractéristiques RPE, mais les contributions majeures aux couplages hyperfins proviennent des protons β et des protons aromatiques en position 3 et 5 (*ortho*).⁴²

III.4. Etude du radical tyrosyle par modélisation moléculaire

Des études de modélisation moléculaire sous MOPAC ont permis de calculer les valeurs des constantes de couplage hyperfin isotrope, d'étudier la géométrie (valeurs des angles, longueur des liaisons) ainsi que la distribution des densités de spin. Ces données ont permis de déduire celles des constantes de couplage hyperfin anisotrope et de constater qu'elles étaient en adéquation avec les résultats expérimentaux fournis par l'ENDOR pour le PSII et la RNR.¹³²

L'effet de l'environnement, des liaisons hydrogène, de l'état de charge, des paires d'ions diffère nettement entre radical tyrosyle libre et dans les protéines. Il est possible de modéliser l'effet de ces perturbations. Wu a mesuré l'effet des liaisons H (engendrées par deux molécules d'eau) et l'influence d'un appariement du radical phénoxy avec un ion sodium sur la distribution de la densité de spin et les interactions hyperfines.¹³³ Ceux-ci montrent une redistribution de la densité de spin de l'oxygène vers le carbone C₄.

Les modifications induites sur le tenseur *g* par la présence de liaisons hydrogène peuvent également être prédites par simulation afin de déterminer quel est l'environnement du radical.¹³⁴ En soi, la modélisation reste un outil efficace pour aider à assigner les paramètres

obtenus expérimentalement.

III.5. Mécanisme rédox de formation du radical

L'initiation des radicaux tyrosyle au sein des enzymes et leur propagation procèdent majoritairement *via* le mécanisme de transfert d'électron couplé à un transfert de proton (PCET, *Proton-Coupled Electron Transfer*).³⁰ Les réactions enzymatiques fonctionnant généralement avec des énergies libres de réaction faibles, une déprotonation couplée au transfert d'électron est souvent nécessaire pour que l'oxydation d'un acide aminé soit finalement un processus exergonique.¹¹⁴

Le transfert de proton est généralement limité à de courtes distances par rapport au transfert d'électron, qui lui peut s'effectuer sur de plus longues distances. Les enzymes s'affranchissent de ce problème en jouant sur les facteurs cinétiques et thermodynamiques. Ainsi les transferts d'électron et de proton peuvent s'effectuer de manière totalement indépendante.¹³⁵ Le mécanisme de transfert d'électron couplé à un transfert de proton a été étudié de manière extensive dans la littérature pour le PSII et la RNR.

Les données thermodynamiques montrent que l'oxydation de Tyrz par P_{680}^+ s'effectue par un transfert d'électron couplé à un transfert de proton rapide facilité par le réseau de liaisons hydrogène environnant.¹³⁶ Electron et proton sont expédiés dans différentes directions. Le mécanisme du PCET bidirectionnel n'est pas encore élucidé. L'électron n'est pas transféré *via* les liaisons hydrogène. Il semblerait que le transfert du proton à une base (le plus probablement une His, mais aussi sur les groupements carboxylates d'Asp ou Glu) ait lieu avant l'oxydation.¹³⁷ En revanche, la réduction de Tyrz[•] s'effectue par transfert d'un atome d'hydrogène : le radical tyrosyle arrache un atome d'hydrogène de la molécule d'eau liée au cluster de manganèse (cf. Schéma I-2, p. 16).^{138,139}

Le mécanisme catalytique de la RNR de classe I passe également par un transfert d'électron couplé à un transfert de proton (Schéma I-1, p. 14) entre les deux résidus fondamentaux pour la catalyse, i.e. le radical tyrosyle où est généré le premier radical et le radical thiyle intervenant dans la réduction du substrat.¹⁴⁰ Le modèle proposé provient de l'étude de la structure cristallographique couplée à de la modélisation.¹⁴¹ Ce mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène est soutenu à la fois par des études théorique (modélisation)¹⁴² et expérimentale.¹⁴³⁻¹⁴⁷ Il est proposé que plusieurs résidus intermédiaires soient impliqués dans le transfert d'électron.

III.6. Action antioxydante de la tyrosine vis-à-vis de composés biologiques

Cette partie traite de la capacité moins connue de la tyrosine à réparer d'autres molécules, révélant ainsi son caractère antioxydant.

III.6.1. Action antioxydante sur les macromolécules

III.6.1.a. Cas des protéines

III.6.1.a.1. Phénomène global

Les protéines transmembranaires sont enrichies de manière prononcée en résidus tyrosine et tryptophane quel que soit le type de protéine, notamment à l'interface de la bicouche lipidique et l'extérieur. Leur présence au sein des protéines membranaires servirait à ancrer les protéines dans la zone interfaciale grâce à la structure plane des cycles aromatiques, garantissant l'interaction du nuage π -électronique avec les têtes polaires des lipides. De plus, la densité électronique sur les cycles aromatiques aiderait à la translocation des cations par interaction électrostatique, leur facilitant la traversée de la membrane.¹⁴⁸ Le tryptophane servirait également à la stabilisation des domaines d'hélices α transmembranaires. Mais ces explications ne sont pas entièrement satisfaisantes. Moosmann *et al.* ont démontré qu'en présence de peptides ou de lipides contenant des résidus Tyr et Trp, des cellules soumises à un stress oxydant à forte dose étaient protégées de l'oxydation conduisant à la mort cellulaire.¹⁴⁹

Les résidus Tyr et Trp réduisent les radicaux peroxyde des chaînes lipidiques, pour donner des radicaux phénoxy et indolye plus stables, empêchant la réaction inverse de se produire. Grâce à la fluidité dynamique des bicouches lipidiques et à leur polarité supérieure à celle des résidus non oxydés, les radicaux peuvent ensuite venir à la surface de la bicouche pour être réduits par les réducteurs hydrosolubles tels que le glutathion ou l'acide ascorbique présents en solution.

Ainsi, la vulnérabilité de certaines membranes pauvres en protéines membranaires vis-à-vis d'un stress oxydant pourrait s'expliquer par le manque en résidus Tyr et Trp.

III.6.1.a.2. Réaction ultérieure avec le tryptophane

En présence d'oxydant à haut potentiel rédox (N_3^\bullet , Br_2^\bullet), ce sont les résidus tryptophane qui sont les plus oxydés si on analyse le spectre d'absorption d'une solution de

lysozyme. La proportion de radicaux tyrosyle formés dans les premiers instants de la réaction est plus faible que celle des radicaux tryptophanyle, puis, au cours du temps, on observe la formation du radical tyrosyle, par réaction intramoléculaire entre Trp^\bullet et Tyr.⁶⁴ Ce phénomène est assez général : en l'absence d'antioxydant, le transfert d'électron entre les radicaux Trp^\bullet et des résidus tyrosine pour former des radicaux Tyr^\bullet aboutit à la formation de ponts dityrosine inter-protéines.

Les constantes de vitesse ont été mesurées pour des dipeptides Trp-Tyr et Tyr-Trp. La position des résidus l'un vis-à-vis de l'autre a une influence sur la vitesse de réaction. Le mécanisme résulte d'un transfert de charge intramoléculaire *via* la liaison peptidique (Schéma I-16).¹⁵⁰ La réaction unidirectionnelle s'explique par les données thermodynamiques pour Trp et Tyr.

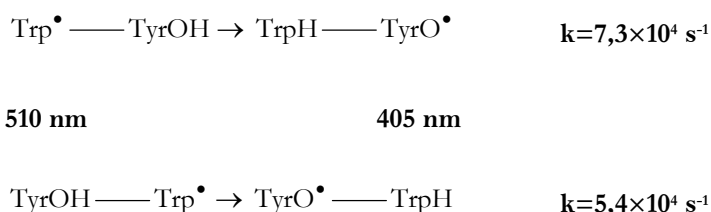


Schéma I-16 : transfert de charge intramoléculaire *via* la liaison peptidique et constantes de vitesse

La réaction d'oxydation du Trp par Tyr est pH-dépendante et a lieu à $\text{pH} < 3$ et $\text{pH} > 12$. En revanche à pH neutre, le potentiel rédox du couple $[\text{TrpNH}]^{*+}/\text{TrpNH}$ est plus élevé que celui de $[\text{TyrOH}]^{*+}/\text{TyrOH}$ (1,05 V *vs* 0,93 V),¹¹⁵ donc Trp^\bullet oxyde TyrOH , avec $\Delta G^\circ = -8 \text{ kJ.mol}^{-1}$, expliquant la vitesse de transfert électronique lente observée dans les protéines. Si la tyrosine est déprotonée, la réaction est beaucoup plus rapide.¹¹⁶

III.6.1.b. Cas des lipides

L'oxydation des LDL (*Low Density Lipoprotein*, protéine responsable du transport du cholestérol) joue un rôle dans la pathologie liée à l'athérosclérose. En présence de tyrosine (et dans une moindre mesure de tryptophane), les LDL sont protégées de l'oxydation induite par l'ion peroxy-nitrite ONOO^- (dont la forme acide se décompose ensuite en HO^\bullet et NO_2^\bullet) sur les lipides. Cependant, l'analyse des composés formés lors de la réaction de la tyrosine avec l'acide peroxy-nitreux révèle que peu de nitrotyrosine et de dityrosine sont formées. Le mode d'action de la tyrosine reste obscur, même si le passage par le radical phénoxyyle est évoqué.¹⁵¹

III.6.1.c. Cas de l'ADN

Les radicaux guanyle de l'ADN sont produits par irradiation, photoionisation,

oxydation chimique, etc. On retrouve majoritairement cette espèce radicalaire puisque le radical issu de la guanine est le plus stable parmi ceux provenant des autres bases de l'ADN (plus faible potentiel rédox). *In vivo*, ces radicaux à pouvoir oxydant élevé semblent être réparés par des espèces antioxydantes. Cependant, la localisation des radicaux guanyle, enfouis au sein d'un réseau compact de chromatine, peut empêcher leur réparation par de telles molécules. Se pourrait-il qu'ils soient réparés *via* les acides aminés des histones intimement liées à l'ADN ? Le produit majeur obtenu dans le cas de l'ADN double brin est le composé 7,8-dihydroxy-8-oxoguanine dérivant du radical guanyle ayant réagi avec l'oxygène.¹⁵² Milligan *et coll.* ont montré la capacité de certains acides aminés libres (Cys, Met, His, Trp, Tyr)¹⁵³ ou à l'intérieur d'un peptide chargé positivement (Lys-Tyr-Lys)¹⁵⁴ à réparer *in vitro* les radicaux produits en présence d'oxygène.

Les potentiels rédox de chacune des espèces mises en jeu corrélerent avec les résultats obtenus, puisque celui du radical guanyle/guanine est plus élevé (1,29 – 1,39 V) que celui de la tyrosine et des autres acides aminés testés.

La tyrosine est considérée comme étant le résidu acide aminé le plus important, à la fois à cause de son abondance élevée dans la séquence d'acides aminés des histones et de sa réactivité. La constante de vitesse intramoléculaire entre tyrosine et radical guanyle, puisque dans le milieu cellulaire la réaction de réparation est décrite comme telle en raison de la configuration de l'édifice ADN-histone, est calculée à partir des données intermoléculaires et de la documentation fournie par la littérature. Sa valeur est estimée à $4 \times 10^3 - 1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, ce qui est plus rapide que la vitesse de réparation des radicaux guanyle par l'ascorbate ou le glutathion.

Ces résultats soulignent l'importance du phénomène de réparation des radicaux guanyle induit par les acides aminés des histones en interaction avec l'ADN. Cependant, l'attaque des radicaux hydroxyle sur les bases de l'ADN est délétère, puisque le radical obtenu est un adduit oxydé et non le radical guanyle. La réparation par transfert d'atome d'hydrogène conduira donc à une espèce non radicalaire mais oxydée. Des études similaires portant sur les radicaux cationiques de l'adénine ont abouti à prouver l'effet réparateur de la tyrosine sur ces substrats.¹⁵⁵

D'autre part, Wagenknecht *et coll.* ont étudié l'oxydation de résidus tyrosine et tryptophane (dans des peptides Lys-Trp-Lys et Lys-Tyr-Lys) liés à l'ADN à travers un transfert de charge arbitré par l'ADN en utilisant la technique de “*flash-quench*” sur des composés Ru(II) intercalés dans les bases de l'ADN, qui s'oxydent ensuite en Ru(III) à fort potentiel oxydant. Les intermédiaires formés sont détectés par RPE ou spectroscopie

d'absorption.¹⁵⁶ La tyrosine répare certes le radical guanyle, pour former un radical tyrosyle, mais a tendance à former des adduits avec l'ADN (pontage adénine-tyrosine et thymine-tyrosine). Dans le radical tyrosyle, l'électron non apparié est délocalisé sur le cycle aromatique impliqué dans l'interaction avec les bases de l'ADN, facilitant la réticulation au détriment de la réparation.

III.6.2. Action antioxydante de la tyrosine dans les fluides biologiques

Le caractère antioxydant de la tyrosine, dû à la fonction phénol, a été démontré en 1997 par l'équipe de Yen.¹⁵⁷ Des analogues de tyrosine possèdent également la même propriété, fortement dépendante du nombre de fonctions hydroxyle sur le cycle benzénique.

Le fait que la tyrosine soit un composé contribuant à la capacité antioxydante du plasma séminal a été mis en évidence par l'équipe de van Overveld.¹⁵⁸ La cinétique de réaction de la tyrosine contenue dans le plasma vis-à-vis du radical de l'ABTS, servant la plupart du temps de substrat modèle pour déterminer le pouvoir antioxydant d'un composé, est lente ; l'intérêt d'une telle cinétique peut résider dans le fait que des intermédiaires radicalaires sont indispensables à certaines fonctions physiologiques et que la réaction immédiate d'antioxydants avec ces radicaux inhiberait leur rôle biologique. D'autre part, si la prolifération non contrôlée de radicaux devait subvenir, le plasma possède un panel d'antioxydants avec des cinétiques différentes permettant de limiter les effets délétères. De plus, la tyrosine en tant qu'antioxydant a été isolée en quantité importante à partir d'extraits de placenta humain.^{1,159}

Conclusion

L'étude des radicaux intervenant dans le cycle catalytique de certaines enzymes représente un vaste champ d'investigation et nécessite l'utilisation combinée de techniques spectroscopiques et de marquage chimique. La spectroscopie RPE s'est révélée être un outil puissant, mais elle ne permet pas toujours de lever l'indétermination sur le positionnement exact des radicaux. Elle nécessite le recours à des modifications chimiques *via* l'utilisation de marqueurs de spin soit neutres soit radicalaires, pouvant entraîner des modifications de la structure et du fonctionnement de l'enzyme. Des méthodes de modélisation ont été développées, mais font appel aux données expérimentales de RPE et de cristallographie par RX, pas toujours disponibles.

De plus, pour les protéines impossibles à exprimer, donc à modifier par mutagenèse dirigée, ou pour les protéines obtenues dans de faibles quantités, il est souvent difficile de conclure quant à la localisation exacte et incontestable du résidu siège de l'oxydation.

Les méthodes existantes ne sont donc pas entièrement satisfaisantes. Celle qui a été développée au laboratoire repose sur le concept d'échange isotopique, donc n'entraîne pas *a priori* de modifications structurales, et a montré sa capacité à décrire, acide aminé par acide aminé, la zone d'interaction d'un complexe protéique. La force de cette méthodologie repose sur le piégeage de radicaux carbocentrés, impliquant que l'étiquette ainsi accrochée est liée de manière covalente donc irréversible. Elle ne va pas, par conséquent, disparaître, se modifier ou s'échanger avec les hydrogènes environnants au cours du traitement et de l'analyse.

Il reste à savoir si cette méthode est applicable à des radicaux produits lors du mécanisme enzymatique lui-même, suffisamment stables pour intervenir directement ou indirectement dans la catalyse enzymatique. Cette technique, simple à mettre en œuvre, représenterait un gain de temps pour quiconque voudrait déterminer la nature et la localisation des radicaux portés par des acides aminés. Ainsi, seraient obtenus, de manière très rapide, les sites d'oxydation alternatifs utilisés par les enzymes. Par conséquence, la mise en œuvre de toute autre technique lourde comme la mutagenèse dirigée ou l'utilisation de bactéries auxotrophes à certains acides aminés serait évitée, ainsi que les méthodes de modification chimique ou d'utilisation de molécules "*spin trap*" pouvant conduire à des erreurs d'interprétation.

Cela permettrait bien évidemment dans le cas où les localisations exactes ne sont pas connues, comme c'est le cas pour le radical tyrosyle de la catalase de foie de bœuf (BLC), de mieux appréhender le rôle de ces cofacteurs.

L'étude du marquage au tritium du radical tyrosyle de la catalase bovine permettant d'accéder à son site de formation fait l'objet du chapitre II. On veut ainsi montrer que ce radical peut être piégé par un atome de tritium apporté par l'agent utilisé dans notre laboratoire de manière stable. Après un rappel bibliographique des principales caractéristiques de la BLC, nous détaillerons l'étude préliminaire de spectroscopie RPE permettant de visualiser la capture du radical par le vecteur de tritium, puis nous présenterons les résultats obtenus pour les expériences de marquage au tritium.

Bibliographie du chapitre I

- ¹ J. A. Stubbe, Radicals with a controlled lifestyle, *Chem. Commun.* **2003**, 2511-2513.
- ² M. S. Rogers, E. M. Tyler, N. Akyumani, C. R. Kurtis, R. K. Spooner, S. E. Deacon, S. Tamber, S. J. Firbank, K. Mahmoud, P. F. Knowles, S. E. V. Phillips, M. J. McPherson, D. M. Dooley, The Stacking Tryptophan of Galactose Oxidase: A Second-Coordination Sphere Residue that Has Profound Effects on Tyrosyl Radical Behavior and Enzyme Catalysis, *Biochemistry* **2007**, *46*, 4606-4618.
- ³ P. A. Frey, Radical mechanisms of enzymatic catalysis, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 121-148.
- ⁴ J. Stubbe, W. A. van der Donk, Protein Radicals in Enzyme Catalysis, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 705-762.
- ⁵ A. Ehrenberg, P. Reichard, Electron Spin Resonance of the Iron-containing Protein B2 from Ribonucleotide Reductase, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3485-3488.
- ⁶ B. M. Sjöberg, P. Reichard, Nature of the free radical in ribonucleotide reductase from Escherichia coli, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 536-541.
- ⁷ B. M. Sjöberg, P. Reichard, A. Graslund, A. Ehrenberg, The tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from Escherichia coli, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6863-6865.
- ⁸ J. Stubbe, Ribonucleotide reductases, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1990**, *63*, 349-419.
- ⁹ M. Fontecave, P. Nordlund, H. Eklund, P. Reichard, The redox centers of ribonucleotide reductase of Escherichia coli, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1992**, *65*, 147-183.
- ¹⁰ J. Stubbe, Di-iron-tyrosyl radical ribonucleotide reductases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 183-188.
- ¹¹ C. S. Yee, M. R. Seyedsayamdost, M. C. Y. Chang, D. G. Nocera, J. Stubbe, Generation of the R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase by Intein Chemistry: Insertion of 3-Nitrotyrosine at Residue 356 as a Probe of the Radical Initiation Process, *Biochemistry* **2003**, *42*, 14541-14552.
- ¹² M. R. Seyedsayamdost, J. Stubbe, Site-Specific Replacement of Y356 with 3,4-Dihydroxyphenylalanine in the β 2 Subunit of *E. coli* Ribonucleotide Reductase, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2522-2523.
- ¹³ G. T. Babcock, B. A. Barry, R. J. Debus, C. W. Hoganson, M. Atamian, L. McIntosh, I. Sithole, C. F. Yocum, Water oxidation in photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9557-9565.
- ¹⁴ D. F. Ghanotakis, C. F. Yocum, Photosystem II And The Oxygen-Evolving Complex, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1990**, *41*, 255-276.
- ¹⁵ G. W. Brudvi, W. F. Beck, J. C. de Paula, Mechanism of photosynthetic water oxidation, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1989**, *18*, 25-46.
- ¹⁶ A. W. Rutherford, A. Boussac, Biochemistry: Water Photolysis in Biology, *Science* **2004**, *303*, 1782-1784.
- ¹⁷ B. A. Barry, G. T. Babcock, Tyrosine Radicals are Involved in the Photosynthetic Oxygen-Evolving System, *PNAS* **1987**, *84*, 7099-7103.
- ¹⁸ B. A. Barry, M. K. el-Deeb, P. O. Sandusky, G. T. Babcock, Tyrosine radicals in photosystem II and related model compounds. Characterization by isotopic labeling and EPR spectroscopy, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 20139-20143.
- ¹⁹ J. H. A. Nugent, R. J. Ball, M. C. W. Evans, Photosynthetic water oxidation: the role of tyrosine radicals, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1655*, 217-221.
- ²⁰ A. Zouni, H.-T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, P. Orth, Crystal structure of photosystem II from Synechococcus elongatus at 3.8 Å resolution, *Nature* **2001**, *409*, 739-743.
- ²¹ N. Kamiya, J.-R. Shen, Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from Thermosynechococcus vulcanus at 3.7-Å resolution, *PNAS* **2003**, *100*, 98-103.
- ²² K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center, *Science* **2004**, *303*, 1831-1838.

- 23 A. W. Rutherford, A. Boussac, P. Faller, The stable tyrosyl radical in Photosystem II: why D?, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1655, 222-230.
- 24 G. Avigad, D. Amaral, C. Asensio, B. L. Horecker, The d-Galactose Oxidase of *Polyporus circinatus*, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 2736-2743.
- 25 G. J. Gerfen, B. F. Bellew, R. G. Griffin, D. J. Singel, C. A. Ekberg, J. W. Whittaker, High-Frequency Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of the Apogalactose Oxidase Radical, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 16739-16748.
- 26 M. M. Whittaker, P. J. Kersten, N. Nakamura, J. Sanders-Loehr, E. S. Schweizer, J. W. Whittaker, Glyoxal Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Is a New Radical-Copper Oxidase, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 681-687.
- 27 M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, The active site of galactose oxidase, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 6074-6080.
- 28 D. A. Svistunenko, M. T. Wilson, C. E. Cooper, Tryptophan or tyrosine? On the nature of the amino acid radical formed following hydrogen peroxide treatment of cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1655, 372-380.
- 29 M. S. Rogers, D. M. Dooley, Copper-tyrosyl radical enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 189-196.
- 30 C. J. Chang, M. C. Y. Chang, N. H. Damrauer, D. G. Nocera, Proton-coupled electron transfer: a unifying mechanism for biological charge transport, amino acid radical initiation and propagation, and bond making/breaking reactions of water and oxygen, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1655, 13-28.
- 31 C. A. Rouzer, L. J. Marnett, Mechanism of Free Radical Oxygenation of Polyunsaturated Fatty Acids by Cyclooxygenases, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2239-2304.
- 32 A. L. Tsai, G. Palmer, R. J. Kulmacz, Prostaglandin H synthase. Kinetics of tyrosyl radical formation and of cyclooxygenase catalysis, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17753-17759.
- 33 M. Bennati, T. F. Prisner, New developments in high field electron paramagnetic resonance with applications in structural biology, *Rep. Prog. Phys.* **2005**, 68, 411-448.
- 34 A. Ivancich, P. Dorlet, D. B. Goodin, S. Un, Multifrequency High-Field EPR Study of the Tryptophanyl and Tyrosyl Radical Intermediates in Wild-Type and the W191G Mutant of Cytochrome c Peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5050-5058.
- 35 M. J. Benecky, J. E. Frew, N. Scowen, P. Jones, B. M. Hoffman, EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase, *Biochemistry* **1993**, 32, 11929-11933.
- 36 A. Ivancich, H. M. Jouve, J. Gaillard, EPR Evidence for a Tyrosyl Radical Intermediate in Bovine Liver Catalase, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12852-12853.
- 37 A. Ivancich, H. M. Jouve, B. Sartor, J. Gaillard, EPR Investigation of Compound I in *Proteus mirabilis* and Bovine Liver Catalases: Formation of Porphyrin and Tyrosyl Radical Intermediates, *Biochemistry* **1997**, 36, 9356-9364.
- 38 X. Zhao, S. Girotto, S. Yu, R. S. Magliozzo, Evidence for Radical Formation at Tyr-353 in *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG), *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 7606-7612.
- 39 A. Ivancich, C. Jakopitsch, M. Auer, S. Un, C. Obinger, Protein-Based Radicals in the Catalase-Peroxidase of *Synechocystis* PCC6803: A Multifrequency EPR Investigation of Wild-Type and Variants on the Environment of the Heme Active Site, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14093-14102.
- 40 S. Chouchane, S. Girotto, S. Yu, R. S. Magliozzo, Identification and Characterization of Tyrosyl Radical Formation in *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG), *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 42633-42638.
- 41 T. Spolidakis, J. H. Dawson, D. P. Ballou, Reaction of Ferric Cytochrome P450cam with Peracids: kinetic characterization of intermediates on the reaction pathway, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 20300-20309.
- 42 F. Wu, L. J. Katsir, M. Seavy, B. J. Gaffney, Role of Radical Formation at Tyrosine 193 in the Allene Oxide Synthase Domain of a Lipoxygenase-AOS Fusion Protein from Coral, *Biochemistry* **2003**, 42, 6871-6880.
- 43 L. Yu, M. Blaser, P. I. Andrei, A. J. Pierik, T. Selmer, 4-Hydroxyphenylacetate Decarboxylases: Properties of a Novel Subclass of Glycyl Radical Enzyme Systems, *Biochemistry* **2006**, 45, 9584-9592.
- 44 C. J. Krieger, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, A. M. Spormann, A Stable Organic Free Radical in Anaerobic Benzylsuccinate Synthase of *Azoarcus* sp. Strain T, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 12924-12927.
- 45 T. Selmer, P. I. Andrei, p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*, *FEBS J.* **2001**, 268, 1363-1372.

- ⁴⁶ P. I. Andrei, A. J. Pierik, S. Zauner, L. C. Andrei-Selmer, T. Selmer, Subunit composition of the glycyl radical enzyme p-hydroxyphenylacetate decarboxylase. A small subunit, HpdC, is essential for catalytic activity, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2225-2230.
- ⁴⁷ S. Kacprzak, R. Reviakine, M. Kaupp, Understanding the EPR Parameters of Glycine-Derived Radicals: The Case of N-Acetylglycyl in the N-Acetylglycine Single-Crystal Environment, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 811-819.
- ⁴⁸ E. Mulliez, M. Fontecave, J. Gaillard, P. Reichard, An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of Escherichia coli, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 2296-2299.
- ⁴⁹ X. Sun, S. Ollagnier, P. P. Schmidt, M. Atta, E. Mulliez, L. Lepape, R. Eliasson, A. Gräslund, M. Fontecave, P. Reichard, B.-M. Sjöberg, The Free Radical of the Anaerobic Ribonucleotide Reductase from Escherichia coli Is at Glycine 681, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6827-6831.
- ⁵⁰ C. Jakopitsch, C. Obinger, S. Un, A. Ivancich, Identification of Trp 106 as the tryptophanyl radical intermediate in Synechocystis PCC 6803 catalase-peroxidase by multifrequency Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1091-1099.
- ⁵¹ W. Blodig, A. T. Smith, K. Winterhalter, K. Piontek, Evidence from Spin-Trapping for a Transient Radical on Tryptophan Residue 171 of Lignin Peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *370*, 86-92.
- ⁵² C. A. Bonagura, M. Sundaramoorthy, H. S. Pappa, W. R. Patterson, T. L. Poulos, An Engineered Cation Site in Cytochrome c Peroxidase Alters the Reactivity of the Redox Active Tryptophan, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6107-6115.
- ⁵³ S. Nakani, T. Viriyakul, R. Mitchell, L. B. Vitello, J. E. Erman, Characterization of a Covalently Linked Yeast Cytochromec-Cytochrome c Peroxidase Complex: Evidence for a Single, Catalytically Active Cytochrome c Binding Site on Cytochrome c Peroxidase, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9887-9893.
- ⁵⁴ M. Sivaraja, D. B. Goodin, M. Smith, B. M. Hoffman, Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome c peroxidase compound ES, *Science* **1989**, *245*, 738-740.
- ⁵⁵ C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase, *Nature* **2000**, *405*, 586-590.
- ⁵⁶ M. Byrdin, V. Sartor, A. P. M. Eker, M. H. Vos, C. Aubert, K. Brettel, P. Mathis, Intraprotein electron transfer and proton dynamics during photoactivation of DNA photolyase from E. coli: review and new insights from an "inverse" deuterium isotope effect, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1655*, 64-70.
- ⁵⁷ C. V. Parast, K. K. Wong, J. W. Kozarich, J. Peisach, R. S. Magliozzo, Electron Paramagnetic Resonance Evidence for a Cysteine-Based Radical in Pyruvate Formate-lyase Inactivated with Mercaptopyruvate, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5712-5717.
- ⁵⁸ C. V. Parast, K. K. Wong, S. A. Lewis, J. W. Kozarich, J. Peisach, R. S. Magliozzo, Hydrogen Exchange of the Glycyl Radical of Pyruvate Formate-Lyase Is Catalyzed by Cysteine 419, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2393-2399.
- ⁵⁹ P. K. Witting, A. G. Mauk, Reaction of Human Myoglobin and H₂O₂. Electron transfer between tyrosine 103 phenoxyl radical and cysteine 110 yields a protein-thiyl radical, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16540-16547.
- ⁶⁰ J. Z. Pedersen, A. Finazzi-Agro, Protein-radical enzymes, *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 53-58.
- ⁶¹ V. P. Denysenkov, T. F. Prisner, J. Stubbe, M. Bennati, High-field pulsed electron-electron double resonance spectroscopy to determine the orientation of the tyrosyl radicals in ribonucleotide reductase, *PNAS* **2006**, *103*, 13386-13390.
- ⁶² C. Wei, R. J. Kulmacz, A.-L. Tsai, Comparison of branched-chain and tightly coupled reaction mechanisms for prostaglandin H synthase, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8499-8512.
- ⁶³ A. Ivancich, conversation personnelle, **2007**.
- ⁶⁴ B. M. Hoey, J. Butler, Repair of oxidised amino acid units in proteins by antioxidants, *Life Chem. Reports* **1985**, *3*, 80-90.
- ⁶⁵ M. J. Davies, R. T. Dean, dans *Radical-mediated Protein Oxidation: From Chemistry to Medicine*, Oxford University Press: Oxford, **1997**.
- ⁶⁶ C. L. Hawkins, M. J. Davies, EPR studies on the selectivity of hydroxyl radical attack on amino acids and peptides, *J. Chem.Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 2617-2622.
- ⁶⁷ A. Favier, Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *l'Actualité Chimique* **2003**, 108-115.

- 68 H. Ostdal, H. J. Andersen, M. J. Davies, Formation of Long-Lived Radicals on Proteins by Radical Transfer from Heme Enzymes-A Common Process?, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *362*, 105-112.
- 69 M. Audette, Y. Blouquit, C. Houee-Levin, Oxidative Dimerization of Proteins: Role of Tyrosine Accessibility, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 217-220.
- 70 G. T. Babcock, M. K. El-Deeb, P. O. Sandusky, M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopies of the radical site in galactose oxidase and of thioether-substituted phenol model compounds, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3727-3734.
- 71 M. L. McGlashen, D. D. Eads, T. G. Spiro, J. W. Whittaker, Resonance Raman Spectroscopy of Galactose Oxidase: A New Interpretation Based on Model Compound Free Radical Spectra, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 4918-4922.
- 72 C. Berthomieu, R. Hienerwadel, Vibrational spectroscopy to study the properties of redox-active tyrosines in photosystem II and other proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1707*, 51- 66.
- 73 G. Jeschke, EPR techniques for studying radical enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1707*, 91-102.
- 74 C. C. Lawrence, M. Bennati, H. V. Obias, G. Bar, R. G. Griffin, J. Stubbe, High-field EPR detection of a disulfide radical anion in the reduction of cytidine 5'-diphosphate by the E441Q R1 mutant of Escherichia coli ribonucleotide reductase, *PNAS* **1999**, *96*, 8979-8984.
- 75 A. F. V. Wagner, M. Frey, F. A. Neugebauer, W. Schafer, J. Knappe, The Free Radical in Pyruvate Formate-Lyase is Located on Glycine-734, *PNAS* **1992**, *89*, 996-1000.
- 76 A. Larsson, B. M. Sjöberg, Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase, *EMBO J.* **1986**, *5*, 2037-2040.
- 77 W. A. van der Donk, J. Stubbe, G. J. Gerfen, B. F. Bellew, R. G. Griffin, EPR Investigations of the Inactivation of E. coli Ribonucleotide Reductase with 2'-Azido-2'-deoxyuridine 5'-Diphosphate: Evidence for the Involvement of the Thiyl Radical of C225-R1, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8908-8916.
- 78 M. R. Gunther, R. A. Tschirret-Guth, H. E. Witkowska, Y. C. Fann, D. P. Barr, P. R. Ortiz de Montellano, R. P. Mason, Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin by hydrogen peroxide, *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1293-1299.
- 79 M. J. Davies, Detection and identification of macromolecule-derived radicals by EPR spin trapping, *Res. Chem. Intermed.* **1993**, *19*, 669-679.
- 80 S. Y. Qian, Y. R. Chen, L. J. Deterding, Y. C. Fann, C. F. Chignell, K. B. Tomer, R. P. Mason, Identification of protein-derived tyrosyl radical in the reaction of cytochrome c and hydrogen peroxide: characterization by ESR spin-trapping, HPLC and MS, *Biochem. J.* **2002**, *363*, 281-288.
- 81 W. L. Hubbell, D. S. Cafiso, C. Altenbach, Identifying conformational changes with site-directed spin labeling, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2000**, *7*, 735-739.
- 82 J. A. Silvester, G. S. Timmins, M. J. Davies, Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues, *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, *24*, 754-766.
- 83 M. N. Harris, S. W. Burchiel, P. G. Winyard, J. R. Engen, C. D. Mobarak, G. S. Timmins, Determining the Site of Spin Trapping of the Equine Myoglobin Radical by Combined Use of EPR, Electrophoretic Purification, and Mass Spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1589-1594.
- 84 P. K. Witting, D. J. Douglas, A. G. Mauk, Reaction of Human Myoglobin and H₂O₂. Involvement of a thiyl radical produced at cysteine 110, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20391-20398.
- 85 Y.-R. Chen, R. P. Mason, Mechanism in the reaction of cytochrome c oxidase with organic hydroperoxides: an ESR spin-trapping investigation, *Biochem. J.* **2002**, *365*, 461-469.
- 86 M. R. Gunther, J. A. Peters, M. K. Sivaneri, Histidiny Radical Formation in the Self-peroxidation Reaction of Bovine Copper-Zinc Superoxide Dismutase, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9160-9166.
- 87 C. W. Fenwick, A. M. English, Trapping and LC-MS Identification of Protein Radicals Formed in the Horse Heart Metmyoglobin-H₂O₂ Reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12236-12237.
- 88 A. Filosa, A. M. English, Mass Spectral Analysis of Protein-based Radicals Using DBNBS. Nonradical adduct adduct formation versus spin trapping, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21022-21027.
- 89 P. J. Wright, A. M. English, Scavenging with TEMPO To Identify Peptide- and Protein-Based Radicals by Mass Spectrometry: Advantages of Spin Scavenging over Spin Trapping, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8655-8665.

- ⁹⁰ L. J. Berliner, V. Khramtsov, H. Fujii, T. L. Clanton, Unique in vivo applications of spin traps, *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, *30*, 489-499.
- ⁹¹ B. Bose-Basu, E. F. DeRose, Y. R. Chen, R. P. Mason, R. E. London, Protein NMR spin trapping with [methyl-¹³C(3)]-MNP: application to the tyrosyl radical of equine myoglobin, *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, *31*, 383-390.
- ⁹² C. D. Detweiler, L. J. Deterding, K. B. Tomer, C. F. Chignell, D. Germolec, R. P. Mason, Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide, *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, *33*, 364-369.
- ⁹³ D. C. Ramirez, Y. R. Chen, R. P. Mason, Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical, *Free Rad. Biol. Med.* **2003**, *34*, 830-839.
- ⁹⁴ R. J. Kulmacz, Y. Ren, A. L. Tsai, G. Palmer, Prostaglandin H synthase: spectroscopic studies of the interaction with hydroperoxides and with indomethacin, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8760-8771.
- ⁹⁵ T. Shimokawa, R. J. Kulmacz, D. L. DeWitt, W. L. Smith, Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 20073-20076.
- ⁹⁶ A. Tsai, L. C. Hsi, R. J. Kulmacz, G. Palmer, W. L. Smith, Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5085-5091.
- ⁹⁷ J. L. Clément, B. C. Gilbert, A. Rockenbauer, P. Tordo, Radical damage to proteins studied by EPR spin-trapping techniques, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1463-1470.
- ⁹⁸ J. L. Clément, B. C. Gilbert, A. Rockenbauer, P. Tordo, A. C. Whitwood, Observation of Protein-derived (BSA) Oxygen-centered Radicals by EPR Spin-trapping Techniques, *Free Rad. Res.* **2002**, *36*, 883-891.
- ⁹⁹ K. Takamoto, M. R. Chance, Radiolytic Protein Footprinting with Mass Spectrometry to Probe the Structure of Macromolecular Complexes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 251-276.
- ¹⁰⁰ S. D. Maleknia, M. Brenowitz, M. R. Chance, Millisecond Radiolytic Modification of Peptides by Synchrotron X-rays Identified by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3965-3973.
- ¹⁰¹ J. Q. Guan, M. R. Chance, Structural proteomics of macromolecular assemblies using oxidative footprinting and mass spectrometry, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 583-592.
- ¹⁰² M. B. Goshe, V. E. Anderson, Hydroxyl Radical-Induced Hydrogen/Deuterium Exchange in Amino Acid Carbon-Hydrogen Bonds, *Radiat. Res.* **1999**, *151*, 50-58.
- ¹⁰³ M. B. Goshe, Y. H. Chen, V. E. Anderson, Identification of the Sites of Hydroxyl Radical Reaction with Peptides by Hydrogen/Deuterium Exchange: Prevalence of Reactions with the Side Chains, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1761-1770.
- ¹⁰⁴ B. N. Nukuna, M. B. Goshe, V. E. Anderson, Sites of Hydroxyl Radical Reaction with Amino Acids Identified by ²H NMR Detection of Induced ¹H/²H Exchange, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1208-1214.
- ¹⁰⁵ M. S. Akhlaq, C. Von Sonntag, Free-radical-induced elimination of hydrogen sulfide from dithiothreitol. A chain reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3542-3544.
- ¹⁰⁶ O. P. Thomas, G. Mousseau, S. Oppiliart, A. Coirier, A. Salcedo-Serna, R. Thai, F. Beau, J. P. Renault, S. Pin, J. C. Cintrat, B. Rousseau, Localization and Quantification of Carbon-Centered Radicals on Any Amino Acid of a Protein, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5444-5448.
- ¹⁰⁷ G. Mousseau, Caractérisation des interactions protéine-ligand par échange ¹H/³H, *Thèse de doctorat*, Paris XI, **2007**.
- ¹⁰⁸ I. Ralston, H. B. Dunford, Horseradish peroxidase. XXXII. pH dependence of the oxidation of L-(-)-tyrosine by compound I, *Can. J. Biochem.* **1978**, *56*, 1115-1119.
- ¹⁰⁹ I. M. Ralston, H. B. Dunford, Horseradish peroxidase. XLII. Oxidations of L-tyrosine and 3, 5-diiodo-L-tyrosine by compound II, *Can. J. Biochem.* **1980**, *58*, 1270-1276.
- ¹¹⁰ L. A. Marquez, H. B. Dunford, Kinetics of Oxidation of Tyrosine and Dityrosine by Myeloperoxidase Compounds I and II, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30434-30440.
- ¹¹¹ R. J. Hulsebosch, J. S. van den Brink, S. A. M. Nieuwenhuis, P. Gast, J. Raap, J. Lugtenburg, A. J. Hoff, Electronic Structure of the Neutral Tyrosine Radical in Frozen Solution. Selective ²H-, ¹³C-, and ¹⁷O-Isotope Labeling and EPR Spectroscopy at 9 and 35 GHz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8685-8694.

- ¹¹² M. Sjödin, R. Ghanem, T. Polivka, J. Pan, S. Styring, L. Sun, V. Sundström, L. Hammarström, Tuning proton coupled electron transfer from tyrosine: A competition between concerted and step-wise mechanisms, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 4851-4858.
- ¹¹³ R. C. Sealy, L. Harman, P. R. West, R. P. Mason, The electron spin resonance spectrum of the tyrosyl radical, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3401-3406.
- ¹¹⁴ M. Sjödin, T. Irebo, J. E. Utas, J. Lind, G. Merenyi, B. Akermark, L. Hammarström, Kinetic Effects of Hydrogen Bonds on Proton-Coupled Electron Transfer from Phenols, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13076-13083.
- ¹¹⁵ M. R. DeFelippis, C. P. Murthy, F. Broitman, D. Weinraub, M. Faraggi, M. H. Klapper, Electrochemical properties of tyrosine phenoxy and tryptophan indolyl radicals in peptides and amino acid analogs, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3416-3419.
- ¹¹⁶ A. Harriman, Further comments on the redox potentials of tryptophan and tyrosine, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6102-6104.
- ¹¹⁷ W. T. Dixon, D. Murphy, Determination of the acidity constants of some phenol radical cations by means of electron spin resonance, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1976**, *2*, 1221-1230.
- ¹¹⁸ S. Hay, K. Westerlund, C. Tommos, Moving a Phenol Hydroxyl Group from the Surface to the Interior of a Protein: Effects on the Phenol Potential and pK_A, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11891-11902.
- ¹¹⁹ K. E. Silva, T. E. Elgren, L. Que, M. T. Stankovich, Electron Transfer Properties of the R2 Protein of Ribonucleotide Reductase from Escherichia coli, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14093-14103.
- ¹²⁰ T. Zlateva, L. Quaroni, L. Que, M. T. Stankovich, Redox Studies of Subunit Interactivity in Aerobic Ribonucleotide Reductase from Escherichia coli, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18742-18747.
- ¹²¹ M. L. McCormick, J. P. Gaut, T.-S. Lin, B. E. Britigan, G. R. Buettner, J. W. Heinecke, Electron Paramagnetic Resonance Detection of Free Tyrosyl Radical Generated by Myeloperoxidase, Lactoperoxidase, and Horseradish Peroxidase, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32030-32037.
- ¹²² J. A. Cappuccio, I. Ayala, G. I. Elliott, I. Szundi, J. Lewis, J. P. Konopelski, B. A. Barry, O. Einarsdottir, Modeling the Active Site of Cytochrome Oxidase: Synthesis and Characterization of a Cross-Linked Histidine-Phenol, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1750-1760.
- ¹²³ I. R. Vassiliev, A. R. Offenbacher, B. A. Barry, Redox-Active Tyrosine Residues in Pentapeptides, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23077-23085.
- ¹²⁴ I. Ayala, K. Range, D. York, B. A. Barry, Spectroscopic Properties of Tyrosyl Radicals in Dipeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5496-5505.
- ¹²⁵ C. J. Bender, M. Sahlin, G. T. Babcock, B. A. Barry, T. K. Chandrashekar, S. P. Salowe, J. Stubbe, B. Lindstroem, L. Petersson, An ENDOR study of the tyrosyl free radical in ribonucleotide reductase from Escherichia coli, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8076-8083.
- ¹²⁶ C. Tommos, X.-S. Tang, K. Warncke, C. W. Hoganson, S. Styring, J. McCracken, B. A. Diner, G. T. Babcock, Spin-Density Distribution, Conformation, and Hydrogen Bonding of the Redox-Active Tyrosine Y_Z in Photosystem II from Multiple-Electron Magnetic-Resonance Spectroscopies: Implications for Photosynthetic Oxygen Evolution, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10325-10335.
- ¹²⁷ S. E. J. Rigby, J. H. A. Nugent, P. J. O'Malley, The dark stable tyrosine radical of photosystem 2 studied in three species using ENDOR and EPR spectroscopies, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1734-1742.
- ¹²⁸ K. Warncke, J. McCracken, G. T. Babcock, Structure of the Y_D Tyrosine Radical in Photosystem II as Revealed by ²H Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopic Analysis of Hydrogen Hyperfine Interactions, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7332-7340.
- ¹²⁹ C. W. Hoganson, M. Sahlin, B. M. Sjöberg, G. T. Babcock, Electron Magnetic Resonance of the Tyrosyl Radical in Ribonucleotide Reductase from Escherichia coli, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4672-4679.
- ¹³⁰ F. Dole, B. A. Diner, C. W. Hoganson, G. T. Babcock, R. D. Britt, Determination of the Electron Spin Density on the Phenolic Oxygen of the Tyrosyl Radical of Photosystem II, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11540-11541.
- ¹³¹ R. Sibert, M. Josowicz, F. Porcelli, G. Veglia, K. Range, B. A. Barry, Proton-Coupled Electron Transfer in a Biomimetic Peptide as a Model of Enzyme Regulatory Mechanisms, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4393-4400.
- ¹³² P. J. O'Malley, A. J. Macfarlane, S. E. J. Rigby, J. H. A. Nugent, The geometry and spin density distribution of the tyrosyl radical: a molecular orbital study, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1232*, 175-179.

- 133 P. Wu, P. J. O'Malley, Environmental effects on phenoxyl free radical spin densities and hyperfine couplings, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, *730*, 251-254.
- 134 M. Engstrom, F. Himo, A. Graslund, B. Minaev, O. Vahtras, H. Agren, Hydrogen Bonding to Tyrosyl Radical Analyzed by Ab Initio g-Tensor Calculations, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 5149-5153.
- 135 S. Y. Reece, J. M. Hodgkiss, J. A. Stubbe, D. G. Nocera, Proton-coupled electron transfer: the mechanistic underpinning for radical transport and catalysis in biology, *Phil. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci.* **2006**, *361*, 1351-1364.
- 136 C. Tommos, G. T. Babcock, Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1458*, 199-219.
- 137 F. Rappaport, J. Lavergne, Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1503*, 246-259.
- 138 K. L. Westphal, N. Lydakis-Simantiris, R. I. Cukier, G. T. Babcock, Effects of Sr^{2+} -Substitution on the Reduction Rates of Yz; in PSII Membranes-Evidence for Concerted Hydrogen-Atom Transfer in Oxygen Evolution, *Biochemistry* **2000**, *39*, 16220-16229.
- 139 K. L. Westphal, C. Tommos, R. I. Cukier, G. T. Babcock, Concerted hydrogen-atom abstraction in photosynthetic water oxidation, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, *3*, 236-242.
- 140 J. Stubbe, P. Riggs-Gelasco, Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 438-443.
- 141 U. Uhlin, H. Eklund, Structure of ribonucleotide reductase protein R1, *Nature* **1994**, *370*, 533-539.
- 142 P. E. M. Siegbahn, L. Eriksson, F. Himo, M. Pavlov, Hydrogen Atom Transfer in Ribonucleotide Reductase (RNR), *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10622-10629.
- 143 M. Ekberg, P. Birgander, B. M. Sjöberg, In Vivo Assay for Low-Activity Mutant Forms of Escherichia coli Ribonucleotide Reductase, *J. Bact.* **2003**, *185*, 1167-1173.
- 144 M. Ekberg, S. Potsch, E. Sandin, M. Thunnissen, P. Nordlund, M. Sahlin, B.-M. Sjöberg, Preserved Catalytic Activity in an Engineered Ribonucleotide Reductase R2 Protein with a Nonphysiological Radical Transfer Pathway. The Importance Of Hydrogen Bond Connections Between The Participating Residues, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21003-21008.
- 145 M. Ekberg, M. Sahlin, M. Eriksson, B.-M. Sjöberg, Two Conserved Tyrosine Residues in Protein R1 Participate in an Intermolecular Electron Transfer in Ribonucleotide Reductase, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20655-20659.
- 146 U. Rova, A. Adrait, S. Potsch, A. Graslund, L. Thelander, Evidence by Mutagenesis that Tyr370 of the Mouse Ribonucleotide Reductase R2 Protein Is the Connecting Link in the Intersubunit Radical Transfer Pathway, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23746-23751.
- 147 U. Rova, K. Goodtzova, R. Ingemarson, G. Behravan, A. Graeslund, L. Thelander, Evidence by Site-Directed Mutagenesis Supports Long-Range Electron Transfer in Mouse Ribonucleotide Reductase, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4267-4275.
- 148 F. N. R. Petersen, M. O. Jensen, C. H. Nielsen, Interfacial Tryptophan Residues: A Role for the Cation- π Effect?, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3985-3996.
- 149 B. Moosmann, C. Behl, Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in transmembrane proteins, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5687-5692.
- 150 W. A. Prütz, E. J. Land, Charge Transfer in Peptides, *Int. J. Radiat. Biol.* **1979**, *36*, 513-520.
- 151 S. Kapiotis, M. Hermann, I. Held, A. Muhl, B. Gmeiner, Tyrosine: an inhibitor of LDL oxidation and endothelial cell cytotoxicity initiated by superoxide/nitric oxide radicals, *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 223-226.
- 152 J. L. Ravanat, C. Saint-Pierre, J. Cadet, One-Electron Oxidation of the Guanine Moiety of 2'-Deoxyguanosine: Influence of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2030-2031.
- 153 J. R. Milligan, J. A. Aguilera, A. Ly, N. Q. Tran, O. Hoang, J. F. Ward, O. Journals, Repair of oxidative DNA damage by amino acids, *Nucl. Ac. Res.* **2003**, *31*, 6258-6263.
- 154 J. R. Milligan, N. Q. Tran, A. Ly, J. F. Ward, Peptide Repair of Oxidative DNA Damage, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5102-5108.
- 155 J. Pan, W. Lin, W. Wang, Z. Han, C. Lu, S. Yao, N. Lin, D. Zhu, A kinetic study on the interaction of deprotonated purine radical cations with amino acids and model peptides, *Biophys. Chem.* **2001**, *89*, 193-199.

- ¹⁵⁶ H. A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, DNA-Bound Peptide Radicals Generated through DNA-Mediated Electron Transport, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5483-5491.
- ¹⁵⁷ G. C. Yen, C. L. Hsieh, Antioxidant effects of dopamine and related compounds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1646-1649.
- ¹⁵⁸ F. W. van Overveld, G. R. Haenen, J. Rhemrev, J. P. Vermeiden, A. Bast, Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma, *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *127*, 151-161.
- ¹⁵⁹ S. Togashi, N. Takahashi, Y. Kubo, A. Shigihara, K. Higashiyama, S. Watanabe, T. Fukui, Purification and Identification of Antioxidant Substances in Human-Placenta Extracts, *J. Health Sci.* **2000**, *46*, 117-125.

Chapitre II. Marquage du site actif de la catalase de foie de bœuf

Les catalases sont des enzymes qui permettent la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau (activité catalase), mais peuvent également oxyder d'autres substrats en présence d'H₂O₂ (activité peroxydase). Ces deux classes d'enzymes interviennent pour lutter contre les espèces réactives de l'oxygène responsable du stress oxydant.

Elles sont présentes *a priori* dans tous les organismes aérobies et beaucoup d'organismes anaérobies et sont localisées au niveau des peroxysomes de nombreux tissus (foie, reins, érythrocytes) mais absentes dans le cytosol et les mitochondries. La famille des enzymes à activité catalase regroupe plusieurs types différents d'enzymes comme les catalases monofonctionnelles hémiques, les catalases-peroxydases (bifonctionnelles) hémiques, regroupées sous le nom de KatGs et les catalases à fer. D'autres hémoenzymes ne faisant pas partie de la famille des catalases présentent tout de même cette activité à faible concentration en peroxyde d'hydrogène.

La catalase de foie de bœuf (*Bovine Liver Catalase* ou BLC) est une enzyme disponible commercialement, dont les différentes propriétés biochimiques sont bien connues. C'est donc un modèle enzymatique simple, mais néanmoins intéressant, puisque la localisation et le rôle du radical tyrosyle formé lors de son mécanisme enzymatique ne sont pas encore élucidés.

I. La catalase de foie de bœuf

I.1. Caractéristiques enzymatiques

L'unité de catalase est définie comme la quantité décomposant une μmol de H₂O₂ en une minute à pH 7 et à 37°C. Elle est déterminée en suivant soit la formation d'oxygène par méthode électrochimique, soit la disparition du peroxyde d'hydrogène (visualisation de la diminution de l'absorbance à 240 nm).

L'activité spécifique de la BLC a été mesurée comme étant égale à 91 800 unités/mg de protéine, soit 181 000 réactions par seconde. Elle ne suit pas une cinétique de Michaelis-Menten^{††} sur toute la gamme de concentration, puisqu'à haute teneur en H₂O₂, une partie de l'enzyme est inactivée par oxydation.¹

^{††} Réaction enzymatique : $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$, où $v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$ (équation de Michaelis Menten)

V_{\max} est la limite de la vitesse maximale pouvant être atteinte par l'enzyme au cours de la catalyse.

K_M est la constante de Michaelis, représentant l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Les catalases sont inhibées par des composés tels que l'ion azoture, l'ion cyanure, l'hydroxylamine, l'aminotriazole et le β -mercaptoéthanol.

Entrée	V_{max} ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \mu\text{mol hème}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	K_M (mM)	K_{cat}/K_M^{\ddagger} ($\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)
1	181 000	93	$2,28 \times 10^6$
2	54 000 - 833 000	64 - 537	$0,60 \times 10^6 - 3,86 \times 10^6$

Tableau II-1: paramètres cinétiques calculés pour $[\text{H}_2\text{O}_2] < 0,4 \text{ M}$ pour la BLC (entrée 1) et pour une gamme de 16 catalases (entrée 2)

I.2. Caractéristiques structurales

La séquence primaire de la catalase de foie de bœuf a été totalement déterminée dans les années 80 par Schroeder *et al.*² C'est un tétramère de poids moléculaire 230 kDa, dont chaque unité comporte 506 acides aminés, un site de liaison du NADPH et un hème de type b (Figure II-1). Dans l'état natif, le fer hémique est à l'état Fe(III) haut spin. Cependant, la quantité d'hème totale n'est pas égale à quatre, le pourcentage réel ayant été estimé à 79%. Le reste est sous forme dégradée (ouverture de la porphyrine).³

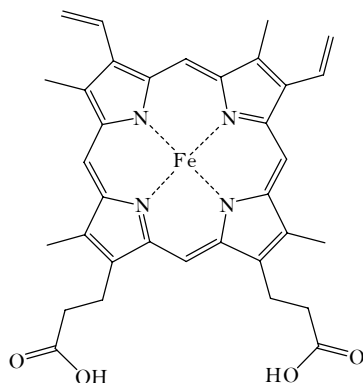


Figure II-1 : structure de l'hème b

Les hélices α représentent 26% et les feuillets β 12% de la molécule. La structure irrégulière de la catalase (brins et boucles) joue un rôle majeur dans l'assemblage du tétramère.

Chaque monomère possède quatre domaines ; le premier domaine comprend les 75 résidus de la partie N-terminale, qui forme un bras avec deux hélices α impliquées dans les interactions avec les autres unités. Le deuxième domaine (domaine $\alpha + \beta$) est le plus grand : il comprend les résidus 76 à 320. Il est composé d'un tonneau β constitué de huit feuillets β anti-parallèles, dont l'extérieur interagit avec le côté distal de l'hème. Les résidus de cette région sont, pour la plupart, constitutifs du tonneau. Trois hélices, comprises entre les deux moitiés

$\ddagger K_{cat}$ est la constante de vitesse catalytique, i.e. la constante de vitesse de la réaction enzymatique.

du tonneau, contribuent à l'hydrophobie du côté distal de l'hème. Le troisième domaine s'étend des résidus 321 à 436. Il constitue l'enveloppe externe de la protéine. Il est très peu structuré à part l'hélice essentielle contenant le résidu Tyr357, ligand proximal du fer. Le dernier domaine comprend la partie C-terminale (résidus 437-506). Il est replié selon quatre hélices. Ce domaine est éloigné du site actif et n'intervient pas dans la reconnaissance avec les autres sous-unités. En revanche, il contribue à former le canal d'accès à l'hème.⁴

La structure aux rayons X datant de 1981, puis corrigée en 1985, montre que l'enzyme active est un tétramère possédant un site de liaison du NADPH et un groupe prosthétique ion métallique-porphyrine IX (Figure II-2). Le cinquième ligand de l'ion est le résidu Tyr357, les quatre autres étant les atomes d'azote des noyaux pyrrole de la porphyrine.^{5,6} Il y a une perte singulière de surface accessible au solvant par réarrangement des quatre sous-unités lors de la formation du tétramère. Des portions du troisième domaine s'associent alors en feuillets β anti-parallèles.

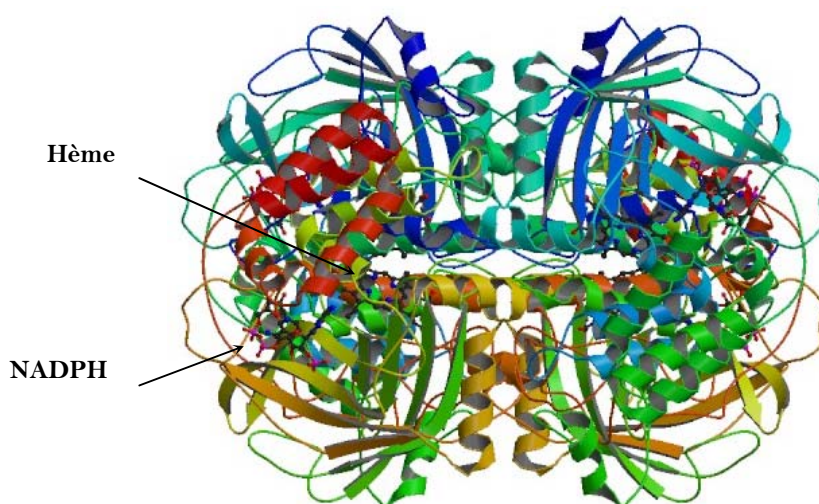


Figure II-2 : structure quaternaire de la BLC (Fita *et al.*, référence 3)

Le site de liaison du NADPH se trouve en surface, tandis que l'hème est enfoui au milieu de chacun des monomères, à 20 Å de la surface et 23 Å du centre du tétramère. La cavité de l'hème est très hydrophobe, à l'exception des groupements fonctionnels tels que Tyr357, His74 et trois résidus arginine en interaction électrostatique avec les acides propioniques de l'hème.³ Le site actif de la BLC est très analogue à celui de la catalase humaine représentée sur les Figures II-3 et II-4.

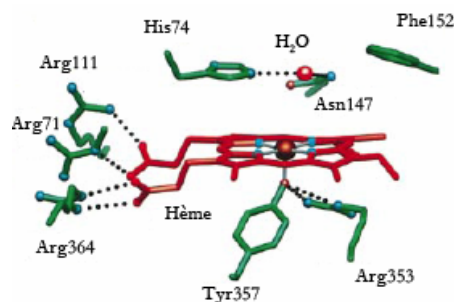


Figure II-3 : Résidus essentiels de la BLC (adapté de la catalase humaine, Putnam *et al.*, référence 7)

Chaque hème est accessible *via* un canal d'accès en forme d'entonnoir long de 20 Å et large de 15 Å à l'extrémité (Figure II-4). Il est constitué de résidus hydrophiles à l'entrée et de résidus hydrophobes plus on se dirige vers l'hème. L'étroitesse du canal permet seulement l'accès de l'enzyme aux molécules de substrat de diamètre de van der Waals inférieur à 3,5 Å.

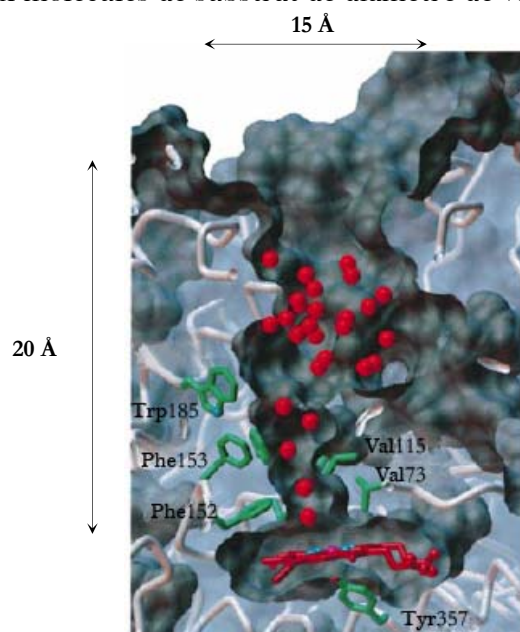


Figure II-4 : canal d'accès à l'hème de la BLC (adapté de la catalase humaine, Putnam *et al.*, référence 7)

Deux autres canaux ont été identifiés en plus du principal, un canal latéral reliant hème et NADPH, permettant un chemin entre les deux groupes prosthétiques et un canal entre l'hème et le centre du tétramère.⁸

I.3. Mécanisme enzymatique général des catalases

La réaction catalytique commence avec l'entrée du peroxyde d'hydrogène dans la cavité de l'hème. A cause de l'étroitesse de la poche, la molécule est contrainte d'interagir avec His74 et Asn147 selon une conformation bien précise. Dans cette position, le cycle catalytique peut avoir lieu. Les liaisons H résultantes avec His74 et le fer proche réduisent la valeur du pK_a du peroxyde, diminuant ainsi la force de la liaison O-H. Un proton est alors transféré d'un atome

d'oxygène de H_2O_2 à l'autre *via* le groupement imidazole ; la liaison O-O s'allonge, se polarise puis se rompt de manière hétérolytique dès qu'un atome d'oxygène du peroxyde se lie au fer. Il se forme une molécule d'eau et une espèce oxydante, le complexe oxoferryle-radical porphyrine, nommé composé I (Schéma II-1). Le composé I est dans un état d'oxydation (+V) partagé entre Fe(IV)=O et le radical π -cationique.

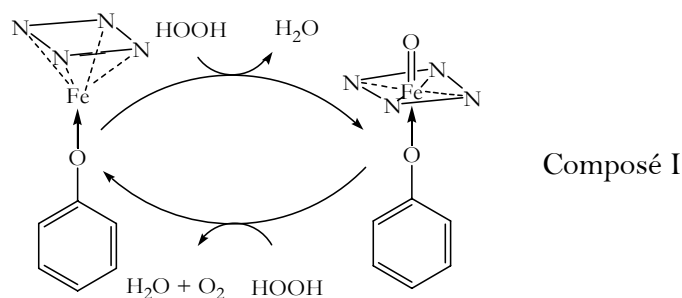


Schéma II-1: mécanisme enzymatique normal de la catalase par formation du composé I

Le composé I (Fe(IV)=O ; $\text{Por}^{\bullet+}$) des peroxydases est réduit par transfert d'un électron provenant du substrat, formant le composé II (Fe(IV)=O). Cette entité réagit à son tour avec une autre molécule de substrat pour former l'enzyme native. Le composé I des catalases, à la fois bon oxydant et donneur d'oxygène, oxyde par un processus à deux électrons une deuxième molécule de peroxyde d'hydrogène (passage Fe(IV)=O ; $\text{Por}^{\bullet+}$ à Fe(III) ; Por), formant, en plus du dioxygène, une molécule d'eau (Schéma II-2).

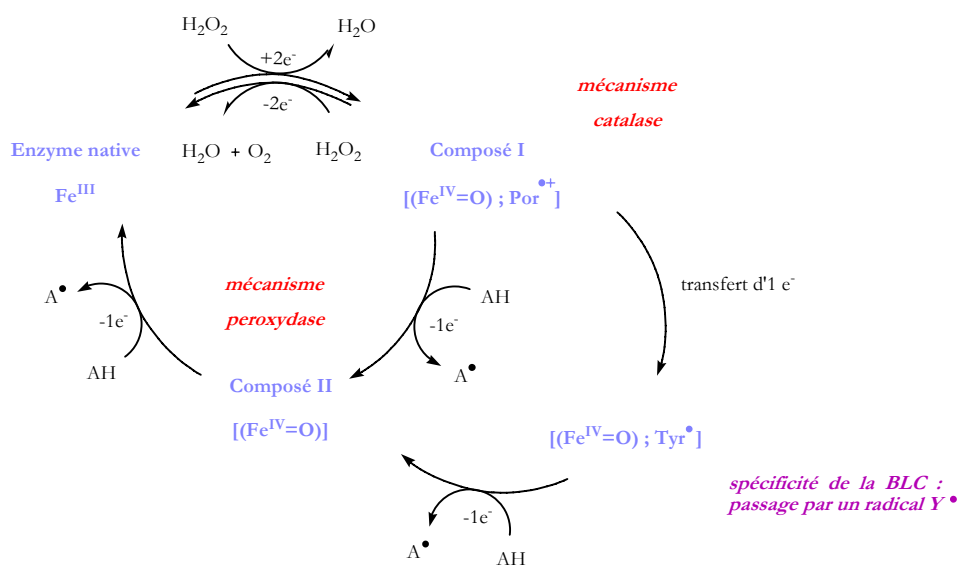


Schéma II-2 : mécanisme catalytique de l'oxydation de H_2O_2 en H_2O et O_2 par les catalases et peroxydases

Sous flux constant de peroxyde d'hydrogène, le composé I des catalases est réduit par un processus à un électron en composé II. Celui-ci ne réagit pas avec H_2O_2 , mais est réduit par une molécule endogène.⁹

D'autre part, il a été montré que la BLC forme intermédiairement un radical tyrosyle, dont la caractérisation spectroscopique est définie dans la partie suivante. Dans ce cas, après formation du composé I, une tyrosine est oxydée par transfert d'électron au radical porphyrine, permettant à cette dernière de revenir à son état natif, avec perte concomitante d'un proton à une base alentour. Ce transfert intramoléculaire permet la formation d'un intermédiaire (Fe(IV)=O ; Tyr^\bullet), qui peut évoluer par réduction vers le composé II.

La vision classique, par opposition à la théorie évolutive, propose que cette réduction finale soit effectuée par le NADPH. Le rôle de ce dernier n'est pas encore totalement élucidé. Trois possibilités ont été avancées. Le NADPH pourrait empêcher l'accumulation du composé II inactif par réduction à un électron. Mais il est également supposé que le cofacteur puisse réduire directement le composé I (processus à deux électrons), évitant ainsi la formation du composé II.¹⁰ Le radical tyrosyle pourrait servir, lui aussi, à limiter l'inactivation de l'enzyme lors de la réaction avec un autre substrat *via* sa capacité de réaction avec le NADPH. Dans ce cas, le NADPH ne réduirait ni le composé I ni le composé II mais le radical tyrosyle.¹¹ Dans les catalases, la formation d'un cofacteur protéique pourrait être reliée au fait qu'elles soient capables ou non de lier le NADPH.

I.4. Mise en évidence de la formation d'un intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O Tyr}^\bullet]$

I.4.1. Preuves expérimentales

Pour la BLC, la formation des différents intermédiaires par réaction avec l'acide peracétique comme substrat a été mise en évidence par RPE, ENDOR, et spectrophotométrie UV.¹²

Par étude comparative avec des catalases à fer hémique de bactéries et de mammifères, Ivancich *et coll.* ont mis en évidence l'apparition d'une espèce radicalaire inattendue, qui pourrait être un intermédiaire du cycle enzymatique de la catalase de foie de bœuf (Schéma II-2).¹³ Les propriétés magnétiques d'un radical organique étant directement corrélées à son identité chimique, l'obtention des valeurs de tenseur g de manière très précise par RPE haut champ et des couplages hyperfins de protons par spectroscopie ENDOR du radical¹⁴ a permis de conclure que le radical de la BLC provenait de l'oxydation d'une tyrosine, à l'instar des radicaux formés dans le photosystème II ($\text{Tyr}^\bullet_{\text{D}}$ ou $\text{Tyr}^\bullet_{\text{Z}}$). Les valeurs des couplages hyperfins du proton β diffèrent de celles mesurées pour les radicaux tyrosyle du Photosystème II et de la ribonucléotide réductase, en raison d'une orientation modifiée du groupement $\text{C}_\beta\text{-H}$ par

rapport au cycle benzénique de la tyrosine. Ces différences ont été corrélées à des variations mineures du spectre RPE à 9 GHz du radical tyrosyle de la BLC.

Ivancich *et coll.* a également mis en évidence par RPE combinée à la technique de congélation après mélange rapide que la formation à basse température de ce nouvel intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O} ; \text{Tyr}^\bullet]$ est précédée de l'apparition du composé I $[\text{Fe(IV)=O} ; \text{Por}^{\bullet+}]$, typique des catalases et peroxydases.¹⁴ Il se forme à l'échelle de la milliseconde et montre le radical porphyrine de spin $\frac{1}{2}$ en interaction ferromagnétique avec l'oxoferryle de spin 1 (Figure II-5).¹⁵ A 220 ms, après transfert intramoléculaire, on observe l'apparition d'un deuxième signal organique à $g \approx 2$. A 15 s, le signal résultant, plus fin, large de 80 G avec une structure hyperfine, se révèle être celui du radical tyrosyle.

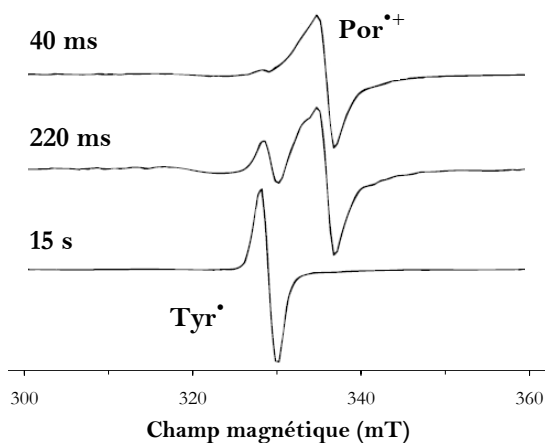


Figure II-5 : Spectre RPE obtenu à 9 GHz et à 4,2 K de la BLC après réaction avec l'acide peracétique, à différents temps de mélange (40 ms, 220 ms, 15 s)

Ce radical est formé à une échelle de temps bien supérieure à celle de la réaction commune de la catalase. Cependant, on peut affirmer qu'il s'agit bien d'un cofacteur et non d'un résidu simplement utilisé par l'enzyme pour effectuer des transferts d'électron. Plusieurs arguments en faveur de cela sont avancés. Le premier est que la durée de vie du radical est relativement longue à basse température. Le second et majeur argument est que la conversion en intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O} ; \text{Tyr}^\bullet]$ est quasiment quantitative par rapport au Fe(III) . En effet, quand l'acide peracétique est ajouté, on observe une diminution de 90% du signal de l'hème en même temps que l'apparition du radical tyrosyle, estimée à 0,8 spin/hème. La quantification du radical tyrosyle a été effectuée par mesure et comparaison de l'intégrale du signal avec celle d'un échantillon témoin du radical tyrosyle du photosystème II.¹⁶

La formation du composé II, silencieux en RPE, a été mise en évidence par spectrophotométrie UV-visible à basse température. Le spectre de l'enzyme native (Figure II-6, spectre A) comporte la bande de Soret à 405 nm et correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du

système aromatique de la porphyrine. Les bandes α et β (634 nm)^{§§} et celles à 500 nm et 536 nm sont attribuées au transfert de charge du métal vers le ligand.⁹

Lors de l'ajout d'acide peracétique (Figure II-6, spectre B), on observe l'apparition de l'intermédiaire avec des bandes typiques de l'espèce $[\text{Fe(IV)=O}]$ *via* le déplacement des bandes de transfert de charge (619 & 634 nm \rightarrow 532 & 566 nm) et de Soret (405 \rightarrow 430 nm). Cette méthode ne permet pas d'obtenir des informations sur la formation du radical tyrosyle, car sa bande d'absorption est confondue avec celle de l'hème.

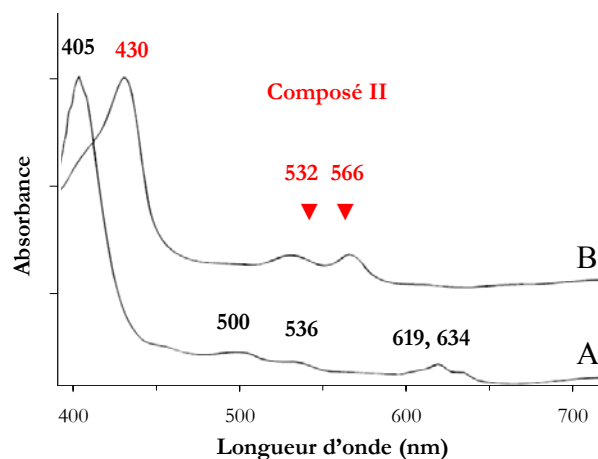


Figure II-6 : Spectre d'absorption à 10 K de la BLC native (A) et traitée à l'acide peracétique (B)

L'espèce $[\text{Fe(IV)=O} ; \text{Por}^{\bullet+}]$ possède quant à elle une bande caractéristique de transfert de charge à 655 nm. Il n'y a pas de déplacement de la bande de Soret, mais on observe une forte diminution de son intensité (hypochromicité).

I.4.2. Etude des liaisons hydrogène du radical

Pour mieux comprendre et généraliser les effets régulateurs que peut exhiber la protéine sur les propriétés physico-chimiques des radicaux, d'autres caractérisations ont été entreprises par la même équipe sur le radical tyrosyle de la BLC. Ainsi, la RPE à haut champ et la spectroscopie Raman de résonance ont été utilisées pour étudier l'effet de l'environnement protéique sur ce radical. Il a été démontré de la sorte qu'il existait une distribution de liaisons hydrogène, avec différentes intensités, sur Tyr^{\bullet} et que la force de cette interaction était dépendante de la valeur du pH. Les liaisons hydrogène présentes pourraient avoir un rôle de stabilisation du radical tyrosyle et/ou de modulateur de son potentiel d'oxydo-réduction.

Les valeurs des résonances Raman et le tenseur g_z (axe de la liaison C-O) pour plusieurs radicaux tyrosyle sont données dans le Tableau II-2 et déduites, pour la BLC, de la

^{§§} La basse température permet de résoudre la bande à 619 nm (α).

Figure II-7. Elles sont sensibles au microenvironnement de la protéine et renseignent par ce biais sur la présence ou non de liaisons hydrogène.

Les valeurs de g_x faibles sont corrélées à de fortes interactions du radical *via* des liaisons H. Cela vient du fait que l'énergie des orbitales non liantes est diminuée en raison de la présence de liaisons hydrogène. Pour la BLC, les valeurs de g_x observées sur le spectre RPE à hauts champs révèlent la présence d'une interaction électrostatique de type liaison hydrogène avec le radical tyrosyle.

<i>Entrée</i>	<i>Nature Tyr</i>	g_x	$\nu_{(C-O)} (cm^{-1})$
1	BLC pH 6, ⁷¹⁷	2,00738	1484
2	BLC pH 5, ²¹⁷	2,00739	1484
3	BLC pH 4, ⁵¹⁷	2,00762	1488
4	PSII Tyr _D	2,00782 ¹⁸	1503 ¹⁹
5	PSII Tyr _Z	2,00750 ²⁰	1512 ¹⁹
6	<i>E. Coli</i> RNR ²¹	2,00912	1498
7	Tyr-HCl	2,00670	1509-1511 ¹⁹

Tableau II-2 : valeurs du tenseur g_x et de la fréquence de résonance Raman (C-O) observées pour les radicaux tyrosyle de différents systèmes

L'anisotropie du facteur g pour la BLC, i.e. la différence $|g_x - g_z|$, est comprise entre celle de la RNR (poche hydrophobe sans résidu pouvant interagir par liaison H) et celle du radical tyrosyle obtenu par irradiation de cristaux de tyrosine-HCl (forte liaison H entre l'oxygène du phénol et l'acide carboxylique). Elle est très proche de celle des radicaux du PSII (force de liaison H intermédiaire).

De façon équivalente, la fréquence du mode d'élongation C-O (ν_{7a}) du radical tyrosyle, observée dans le spectre Raman, est dépendante de la présence de liaison hydrogène ou de la coordination au métal. Les résultats obtenus pour la BLC sont aussi en accord avec la présence d'une liaison H, par diminution de la fréquence de la bande de C-O par rapport à celle de la RNR (Figure II-7).

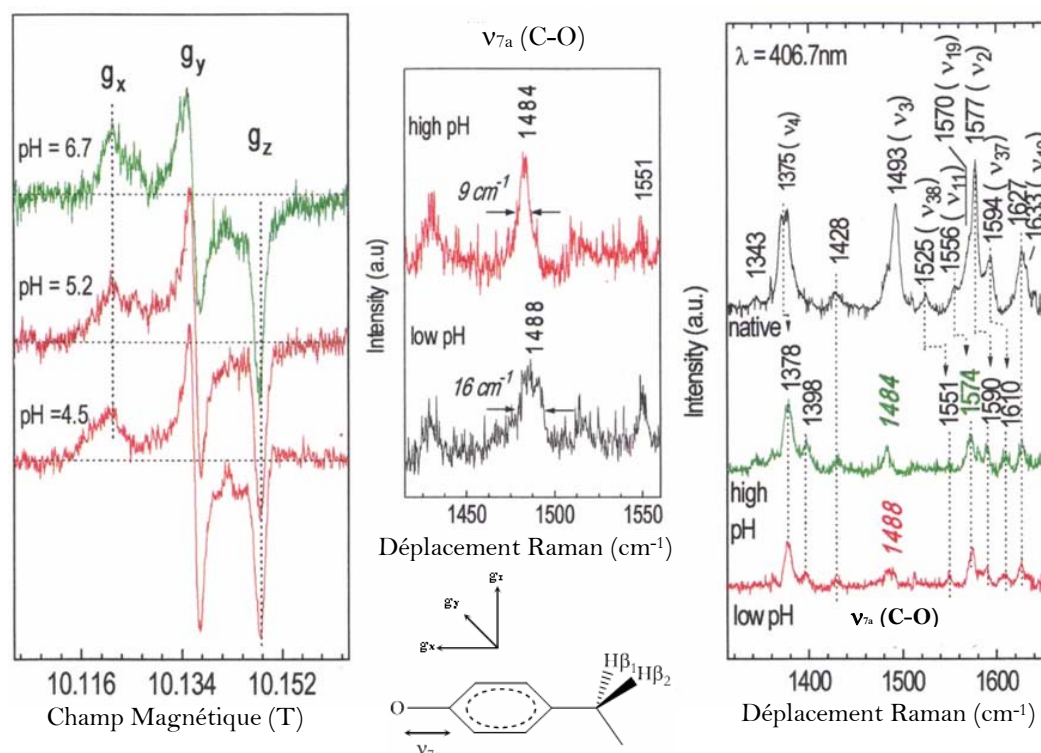


Figure II-7 : Spectre de RPE à haut champ (285 GHz, à gauche) et du Raman de résonance (à droite) du radical tyrosyle de la BLC à plusieurs pH (Ivancich *et al.* référence 17)

I.4.3. Conséquence sur la détermination de la localisation du radical

L'identification des radicaux fait normalement appel à des techniques spectroscopiques combinées à la mutagenèse dirigée et/ou à la deutération sélective du résidu supposé être le site d'oxydation alternatif. Cependant, toute tentative d'expression de la BLC dans une souche bactérienne ayant échoué, il faut avoir recours à d'autres astuces pour pouvoir déterminer la localisation du radical tyrosyle. L'utilisation des données spectroscopiques de RPE haut champ et de Raman, permettant d'estimer la localisation du radical par l'étude des liaisons hydrogène, ont permis de discriminer quelles tyrosines pouvaient être impliquées dans le mécanisme parmi les vingt tyrosines que compte la séquence primaire de la BLC.

Ces résultats, couplés à l'analyse de la structure cristalline, permettent de désigner Tyr259 et Tyr369 comme candidates potentielles (Figure II-8). D'après la structure cristallographique, Tyr259 se trouve en surface, à l'instar du radical protéique de la lignine peroxydase et peut former des liaisons hydrogène avec un résidu aspartate et une molécule d'eau structurale (distance $d_{\text{O}_{\text{Asp}}-\text{O}_{\text{Tyr}}} = 2,5 \text{ \AA}$, liaison H de $1,5 \text{ \AA}$, distance $d_{\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}-\text{O}_{\text{Tyr}}} = 6 \text{ \AA}$), tandis que Tyr369 se trouve enfouie proche de l'hème, de manière analogue au radical Trp^{•+} de la cytochrome c peroxydase. Les sources de liaison H peuvent également être un résidu Asp et une molécule d'eau (distance $d_{\text{O}_{\text{Asp}}-\text{O}_{\text{Tyr}}} = 2,6 \text{ \AA}$, liaison H de $1,6 \text{ \AA}$ avec Asp334, distance

$d_{\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}-\text{O}_{\text{Tyr}}} = 4,3 \text{ \AA}$). His361 pourrait éventuellement créer une liaison H *via* N_ϵ (distance $d_{\text{N}_{\text{His}}-\text{O}_{\text{Tyr}}} = 4,0 \text{ \AA}$).

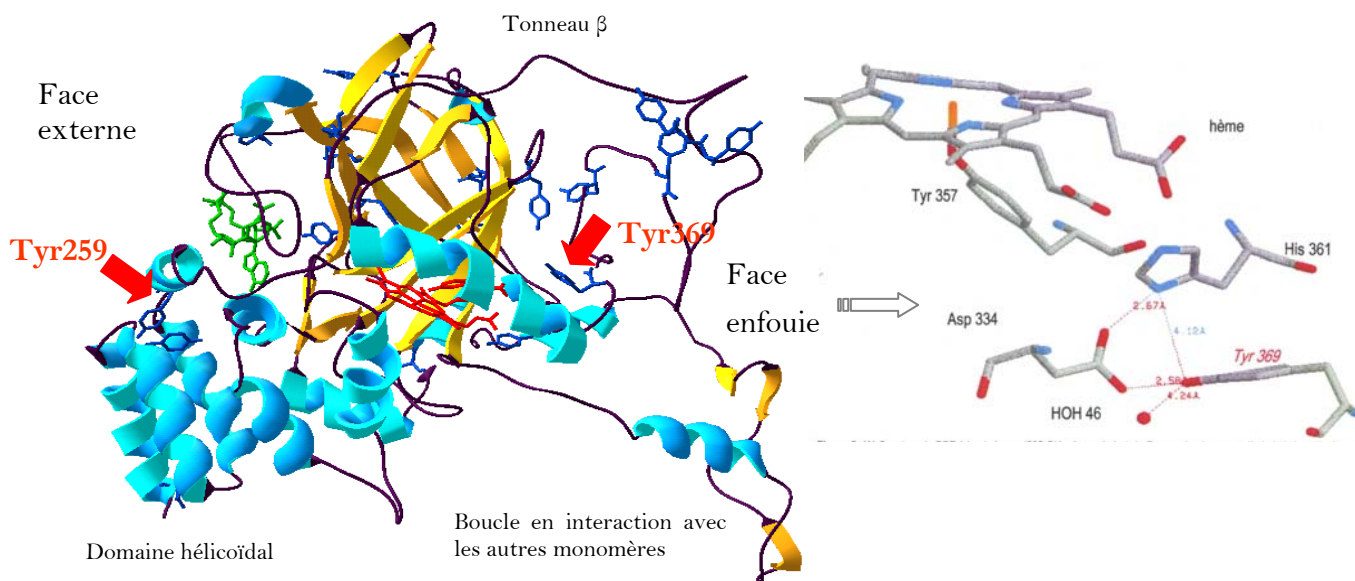


Figure II-8 : A gauche : structure tertiaire du monomère de la BLC. Les résidus en bleu sont les tyrosines, le NADPH en vert et l'hème en rouge. Sont également indiquées les deux tyrosines pouvant porter le radical. A droite : agrandissement de l'environnement de l'hème ligand proximal, Tyr369)

D'autres données dans la littérature proposent les tyrosines qui se trouvent à moins de 19 \AA de l'hème comme site d'oxydation. Seule Tyr369 affiche cette caractéristique.¹⁴ D'autre part, Svistunencko assigne le site de formation du radical de la BLC à Tyr369 par simulation des paramètres que sont la densité de spin sur le carbone 1 et l'angle dièdre θ et comparaison avec les données obtenues par cristallographie RX et RPE.²² Cependant, il manque à ces arguments une preuve expérimentale irréfutable pour affirmer de manière certaine la localisation du site d'oxydation alternatif.

Afin de déterminer le site de formation du radical tyrosyle, nous avons voulu transposer à ce système la méthode développée au laboratoire pour cartographier la surface de protéines, basée sur le piégeage du radical par un atome de tritium (méthode décrite au chapitre I).

En collaboration avec Anabella Ivancich (équipe métalloprotéines et radicaux protéiques du Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes au CEA/Saclay/DSV/iBiTec-S), qui a mis en évidence la formation du radical tyrosyle dans la BLC, nous avons mis au point l'étude combinée de RPE et de marquage en tritium.

II. Etude du marquage au tritium du centre actif de la BLC

II.1. Rappel du principe

Une méthode basée sur l'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$, permettant de localiser les radicaux formés sur les protéines à la suite de l'attaque du radical hydroxyle, a été développée au laboratoire.

Par utilisation du marqueur tritié, nous souhaitons développer une approche simple, efficace et univoque qui nous permette de repérer le site de formation du radical tyrosyle de la BLC.

Cette démarche consiste en premier lieu à générer un radical tyrosyle sur chaque monomère de la BLC par utilisation d'acide peracétique (Schéma II-3). Ce substrat est choisi pour la catalase à la place du peroxyde d'hydrogène, car sa vitesse de réaction avec l'enzyme est beaucoup plus faible et permet l'accumulation du composé I, donc du radical tyrosyle. L'utilisation de ce pseudo-substrat offre l'opportunité d'examiner la nature biophysique des différents intermédiaires catalytiques.¹²

Le radical ainsi formé se délocalise sur le cycle aromatique et sur l'oxygène. L'ajout du sel de l'acide phénylphosphinique tritié devrait permettre de piéger le radical carbocentré par un atome de tritium lors d'un transfert radicalaire, permettant ainsi d'identifier *in fine* le site de la formation du radical.

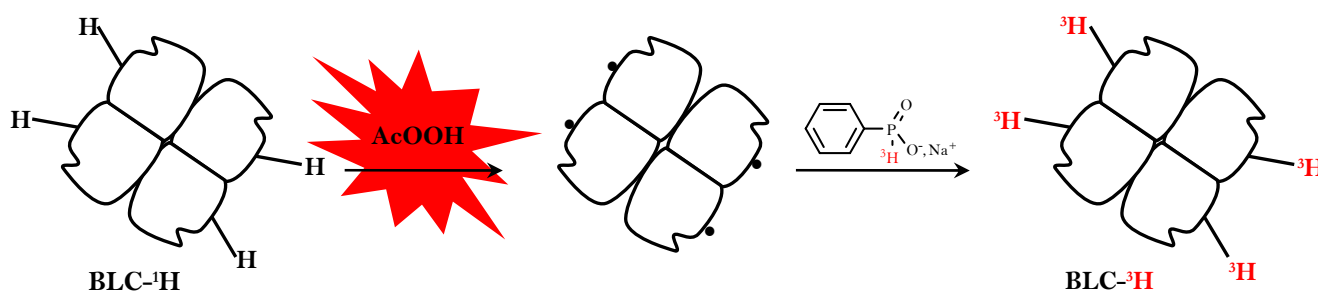


Schéma II-3 : schéma de principe de la méthodologie de marquage de la BLC

La localisation n'est pas directement obtenue par analyse de la protéine telle quelle. Il est nécessaire de la cliver par digestion enzymatique ou chimique en fragments plus petits, voire même d'obtenir l'information à l'échelle de l'acide aminé par séquençage d'Edman après purification par HPLC des peptides marqués (Schéma II-4).

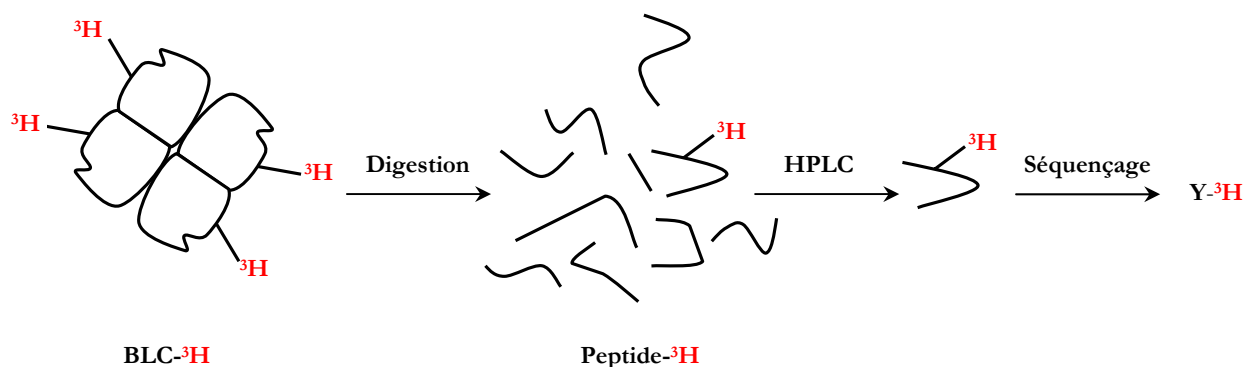


Schéma II-4 : schéma de principe de la méthodologie de localisation de l'acide aminé marqué

Dans un premier temps, le piégeage du radical tyrosyle par le réducteur phosphoré est vérifiée par RPE, puis les expériences de marquage sont réalisées. En effet, si l'on considère que le vecteur doit réagir avec le radical tyrosyle, la méthode de choix pour vérifier si la capture a lieu est la spectroscopie RPE. C'est pourquoi nous avons en premier lieu regardé si la disparition du radical était effective par cette technique avant de commencer la méthode avec le marquage isotopique.

II.2. Etude préliminaire par spectroscopie RPE

Les protocoles utilisés pour les expériences réalisées au sein de ce chapitre sont décrits dans le chapitre V, partie IV.

II.2.1. Stabilité du composé phosphoré vis-à-vis de l'acide peracétique

La première vérification effectuée fut de regarder la stabilité du dérivé phosphoré dans les conditions de réaction par RMN ¹H.

Le spectre RMN ¹H montre le doublet bien caractéristique dû au couplage avec le ³¹P (spin ½) pour le composé initial. Dès que l'on ajoute soit du peroxyde d'hydrogène, soit de l'acide peracétique, on observe une diminution du signal du proton porté par le phosphore, en comparaison avec les signaux aromatiques, mais cette diminution est relativement faible (facteur 2,5 pour 10 équivalents d'acide peracétique en 24 h à température ambiante). Cela signifie que le dérivé phosphinique est certes oxydé par le peracide, mais que ce phénomène est relativement lent et marginal. On considérera donc qu'à l'échelle du temps de la réaction avec la protéine, cette réaction parasite est très minoritaire.

II.2.2. Etude de la capture du radical tyrosyle par spectroscopie RPE

La Figure II-9 représente le spectre RPE mesuré à 4 K et 9 GHz de l'enzyme native.

Seul le signal du Fe(III) avec ses composantes à $g = 6$ et $g = 2$ sont visibles. La distorsion rhombique du Fe(III) (asymétrie due aux ligands axiaux et équatoriaux) entraîne une division du signal en deux composantes à $g = 6$.

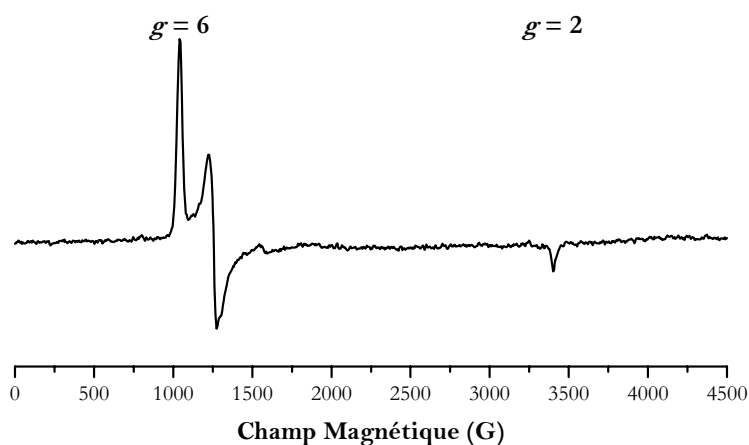


Figure II-9 : Spectre RPE de la BLC native à 4 K, obtenu à 9 GHz

Les conditions d'analyse par RPE de la BLC traitée par l'acide peracétique (PAA) ont été mises au point par A. Ivancich *et coll.* lors de l'étude publiée en 1996.¹³ Les meilleures conditions pour obtenir un rendement maximal en radical sont de réaliser le mélange entre BLC et PAA (30 éq. par rapport à l'hème) à 0°C pendant 15 s, puis de congeler le tube à 77 K pour arrêter la réaction et mesurer les spectres de RPE. Les solutions congelées sont analysées à 4 K pour observer le signal du métal et 40 K pour résoudre les interactions hyperfines noyau-électron du radical organique.

Lors de l'ajout de l'acide peracétique, l'allure du signal de RPE est modifiée en raison de la formation de l'intermédiaire $[\text{Fe(IV)=O} ; \text{Tyr}^\bullet]$. Le signal du Fe(III) décroît drastiquement et un radical organique apparaît à $g = 2$, masquant la composante de l'hème (Figure II-11, courbe rouge).

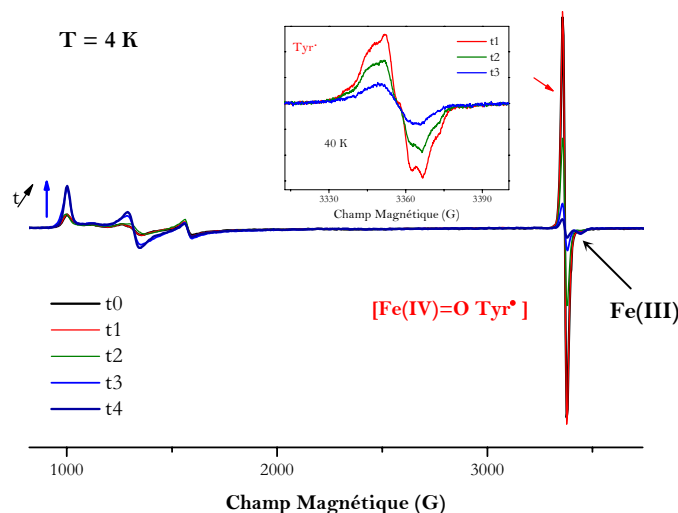
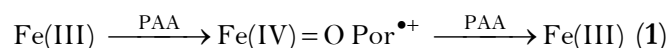


Figure II-10 : spectres RPE à 4 K et 40 K (9 GHz) de la BLC traitée avec l'acide peracétique

A l'échelle de temps à laquelle l'expérience est réalisée, on n'observe que le radical tyrosyle (et non $\text{Por}^{\bullet+}$), formé après transfert intramoléculaire. Après plusieurs incubations successives dans la glace (30, 60, 90 et 120 s), on observe une disparition nette du radical concomitante avec le retour de l'enzyme à la forme ferrique ($g = 6$).

En raison de la compétition entre les deux réactions (1) et (2), il est important de visualiser si la réaction voulue de capture du radical tyrosyle par le vecteur phosphoré est effective.



Afin de former plus de radical tyrosyle, on utilise d'une part un grand excès d'acide peracétique, sinon la réaction (1) est prépondérante et d'autre part des températures plus faibles (radical tyrosyle furtif pour des températures supérieures à 100 K, non observable en RPE). C'est pourquoi nous avons utilisé la spectroscopie RPE. Il n'est pas évident que le composé phosphoré réagisse par transfert d'un atome d'hydrogène avec le radical tyrosyle. Cela nécessiterait qu'il puisse accéder au site actif. Il est aussi possible qu'il réagisse *via* un transfert d'électron à longue distance (à l'instar de la RNR entre Tyr^{\bullet} et Cys).

La préincubation de l'enzyme avec le composé phosphoré avant ajout de l'acide peracétique a été réalisée. L'absence de modification dans le signal de l'hème pour l'enzyme native incubée montre qu'il n'y a pas d'interaction avec le composé qui empêcherait le substrat de réagir. De plus, dans ce cas, après ajout d'acide peracétique, la différence entre le signal du radical Tyr^{\bullet} en présence de vecteur et dans le témoin est peu significative. Cela indique que, dans ces conditions, le vecteur ne réagit pas avec le composé I, qui résulterait en l'absence de signal dû au radical tyrosyle. De plus, la réaction entre le composé phosphoré et $[\text{Fe(IV)=O} ; \text{Tyr}^{\bullet}]$ est plus lente ou moins favorisée que la réaction (2). Il se pourrait que le composé interagisse avec la protéine sans influencer le cycle catalytique (site de fixation externe par exemple).

En fonction de ces résultats préliminaires, nous avons conçu l'expérience de telle sorte à diminuer la réaction de l'enzyme au profit de la réaction avec le vecteur.

L'enzyme est mélangée pendant 15 s avec l'acide peracétique, puis le vecteur est ajouté (deux équivalents par rapport au tétramère). La solution est congelée et analysée par spectroscopie RPE (Figure II-11, courbe noire). Comme les spectres RPE à $t=0$ de l'enzyme en présence de l'acide peracétique avec et sans vecteur sont identiques, on laisse incubé le mélange trente secondes dans la glace, l'échantillon est toujours congelé mais on permet une

élévation de la température plus favorable aux réactions que l'on souhaite observer. Ainsi, la réaction soit avec l'acide peracétique, soit avec le dérivé phosphoré peut avoir lieu. Ensuite on effectue des incubations successives de 90 s et 120 s.

Dans ce cas une diminution de l'intensité du signal du radical tyrosyle est observée dans l'échantillon contenant le vecteur (Figure II-11, courbes bleue et verte) par rapport au témoin. Les intensités sont les mêmes à t_0 et t_1 pour les deux échantillons. Par rapport au spectre obtenu à $t=0$, le signal du radical tyrosyle de l'échantillon témoin décroît d'un facteur 1,5 après t_2 et 3,2 après t_3 . En présence du vecteur, la diminution observée est d'un facteur 1,8 après t_2 et 4,5 après t_3 . L'intensité du radical tyrosyle décroît donc après t_2 et t_3 d'un facteur 1,2 et 1,4 respectivement par rapport au témoin.

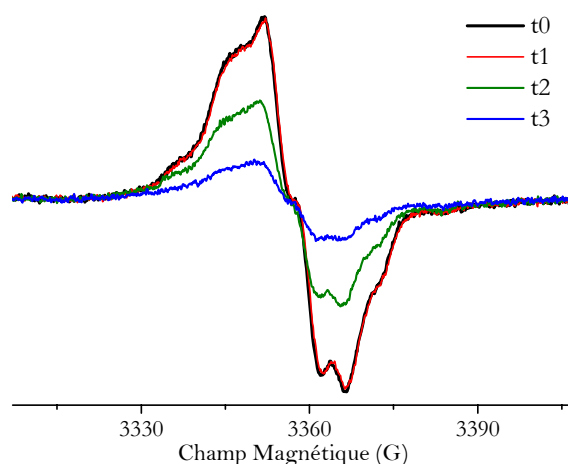


Figure II-11 : comparaison des signaux du radical tyrosyle après différents temps d'incubation dans la glace (40 K, 9 GHz). t_0 =après réaction ; t_1 = incubation 30 s ; t_2 = incubation 90 s ; t_3 = incubation 120 s

Un autre essai avec un temps d'incubation total de trois minutes a montré une diminution de l'intensité du signal de la tyrosine d'un facteur 2,75 lors de l'ajout du composé phosphoré par rapport au témoin (Figure II-12 (courbe bleue et rouge respectivement)).

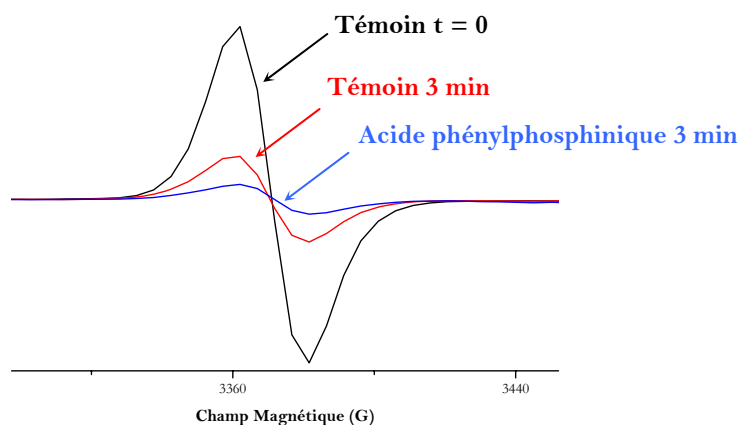


Figure II-12 : signaux RPE centré en $g = 2$ (Y') à 4 K de la BLC traitée à l'acide peracétique : témoin à $t=0$ (courbe noire), à $t=3$ min (courbe rouge) et en présence du sel de l'acide phosphinique à $t=3$ min

(courbe bleue).

D'autre part, le comportement du signal du fer est différent dans le témoin et dans l'échantillon traité avec le sel de l'acide phénylphosphinique (Figure II-13). Dans le témoin, le signal de l'enzyme ferrique reste faible tant qu'il reste de l'acide peracétique (jusqu'à t_2). L'enzyme est sous forme de composé I ou d'intermédiaire (Fe(IV)=O ; Tyr^\bullet). Les transferts électroniques successifs pour retourner vers l'enzyme native sont relativement lents. En revanche, en présence du composé phosphoré, à t_2 , on observe un plus grand signal d'enzyme ferrique ; cela signifie que le vecteur favorise à la fois la réduction de l'intermédiaire (Fe(IV)=O ; Tyr^\bullet) en composé II puis la réduction de celui-ci en Fe(III) .

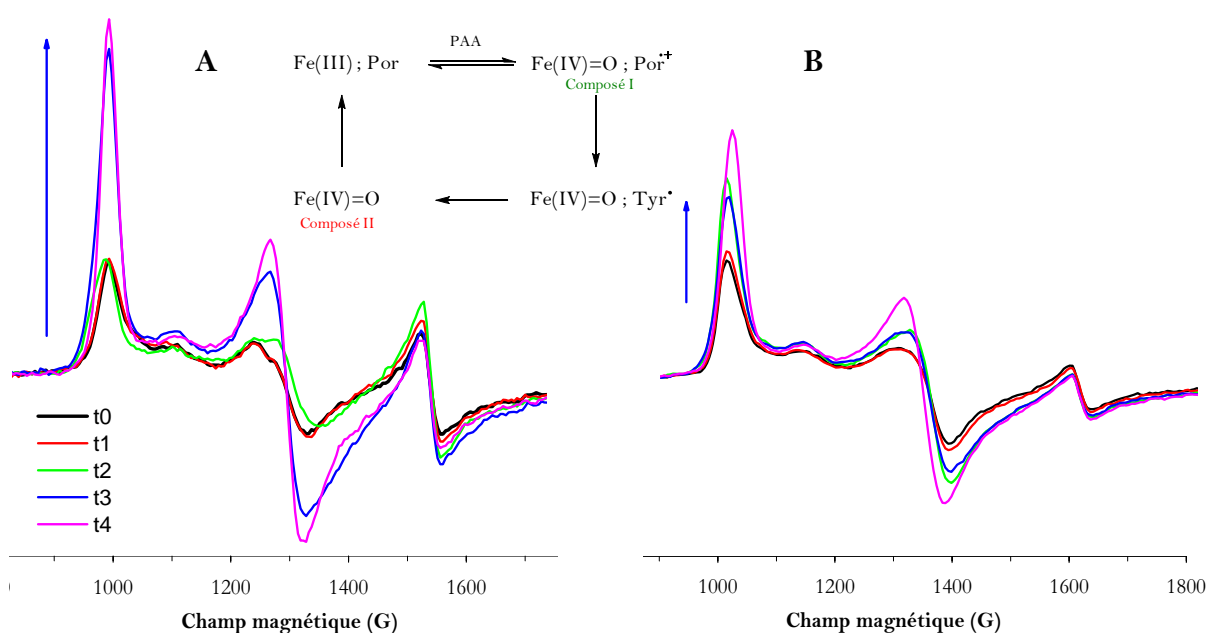


Figure II-13 : Résonance de l'enzyme ferrique $g = 6$ à 4 K de la BLC traitée à l'acide peracétique. A : témoin ; B = en présence du sel de l'acide phénylphosphinique

L'explication des résultats peut être la suivante. Le dérivé phosphoré peut céder un électron par oxydation (Schéma II-5).

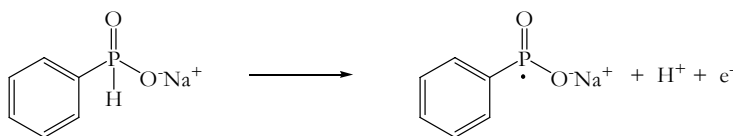


Schéma II-5 : oxydation du dérivé phosphoré

Le mode de fonctionnement du réducteur phosphoré pourrait être analogue à celui supposé du NADPH, par réduction en composé II de l'intermédiaire oxoferryle-radical tyrosyle (diminution du radical tyrosyle). Mais on peut aussi supposer que le dérivé phosphoré réagit directement avec le composé I pour former le composé II. *A priori* ce n'est pas le cas, puisque lors des expériences de pré-incubation de l'enzyme avec le vecteur, nous avons observé

la formation du radical tyrosyle avec un rendement quasi maximal. Si le vecteur réagissait avec le composé I, cela interdirait au radical tyrosyle de se former. Ce dernier subirait à son tour une réduction à un électron *via* le composé phosphoré pour reformer l'ion ferrique de la catalase native (Schéma II-6).

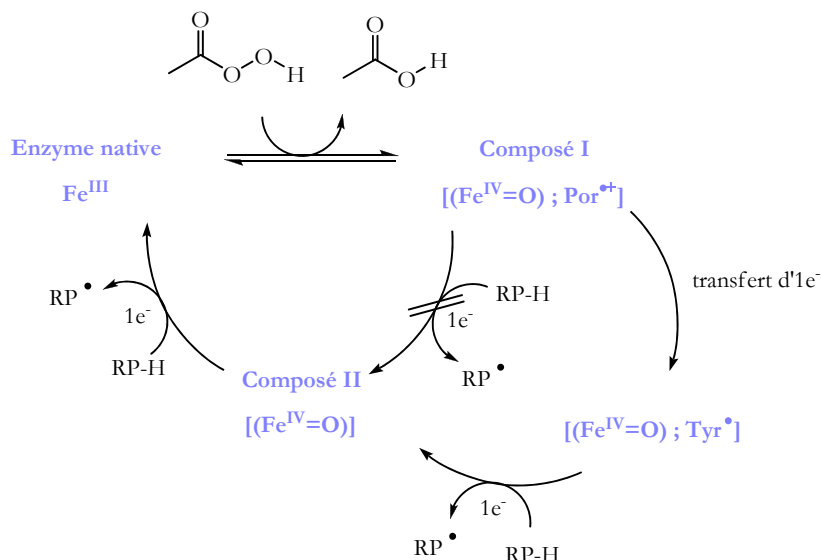


Schéma II-6 : proposition de mécanisme pour la réaction de la BLC et de ses différents intermédiaires avec le réducteur phosphoré.

D'après ces résultats préliminaires, la disparition du radical tyrosyle liée à l'ajout dans le milieu d'un réducteur semble être effective. De plus, la présence de celui-ci ne semble pas gêner le bon déroulement de la réaction. C'est pourquoi les études de marquage par le tritium ont été entreprises.

II.3. Transposition au marquage par le tritium

II.3.1. Synthèse de l'agent tritié

Le sel de sodium de l'acide phénylphosphinique est synthétisé par hydrolyse rapide et quantitative de la dichlorophénylphosphine par l'eau tritiée de très haute activité spécifique préparée *in situ* *via* la réduction du dioxyde de platine par le tritium gaz (Schéma II-7). Les conditions opératoires ont été mises au point avec le deutérium gaz puis transposées au tritium.

Les conditions d'obtention d'un composé hautement enrichi sont drastiques puisqu'il faut éliminer toute trace d'eau "naturelle" susceptible d'hydrolyser la liaison P-Cl, donc de faire chuter l'activité spécifique finale du composé.

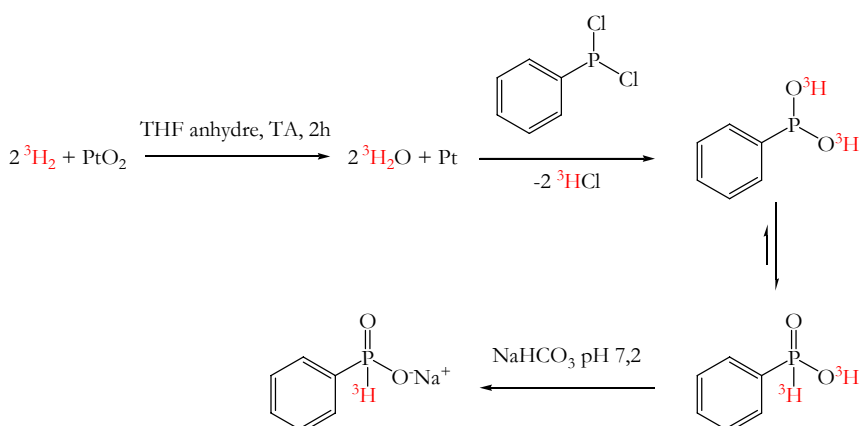


Schéma II-7 : synthèse du sel de sodium du sel de l'acide phénylphosphinique tritié

Le composé obtenu est monotritié, et possède une activité spécifique, selon les lots, comprise entre 144 et 480 GBq.mmol⁻¹ (3,9 à 13,0 Ci.mmol⁻¹), ce qui représente une incorporation isotopique de 13-45%. La plupart des différents lots utilisés lors des expériences de marquage suivantes a été synthétisée par Guillaume Mousseau au laboratoire au cours de sa thèse.

II.3.2. Marquage de la protéine

II.3.2.a. Conditions expérimentales

Les conditions de marquage (Tableau II-3) reprennent exactement le protocole utilisé pour les expériences de RPE (même temps de mélange BLC-Acide peracétique (15 s), congélation). En revanche, le nombre d'équivalents de vecteur par rapport à la BLC a été modifié.

Réactif	Quantité (nmol)	Nombre d'éq./hème
BLC	7,8	1
PAA	1,2 10 ³	48
PhPO ₂ ³ HNa	38,4-153,6	5-20

Tableau II-3 : Conditions utilisées pour la réaction de marquage pour un temps de réaction de 3min

Après réaction de marquage, la protéine purifiée par chromatographie d'échange d'ions et filtration sur gel est ensuite analysée puis isolée par HPLC. On constate du marquage sur la protéine (Figure II-14). Le ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}}$ est égal à 7,8 après échange d'ions et 6,1 après filtration sur gel.

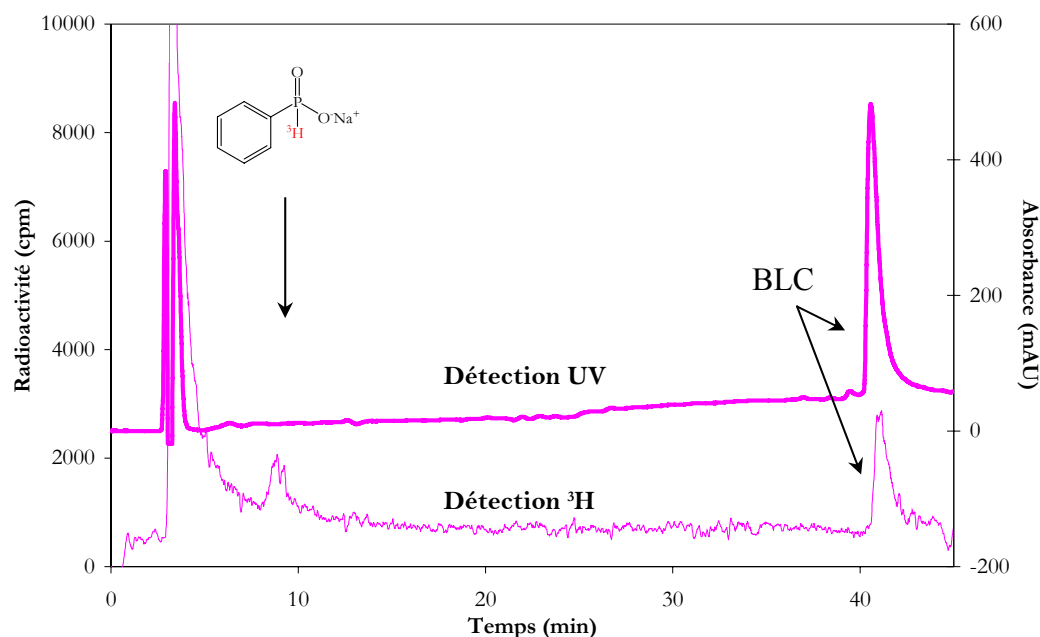


Figure II-14 : Chromatogramme de la BLC marquée après purifications successives par échange d'ions et filtration sur gel (10 éq. de PhPO_2TNa ($\text{AS } 340 \text{ GBq.mmol}^{-1}$), temps de réaction de 10 min)

De l'imagerie radioactive a également été utilisée afin de visualiser la présence de radioactivité associée à la protéine pour la même série. Ceci a été possible grâce à la collaboration avec Fabrice Beau (CEA/Saclay/DSV/SIMOPRO). La Figure II-15 montre qu'après les trois étapes de purification, il reste toujours du marquage associé à la protéine.

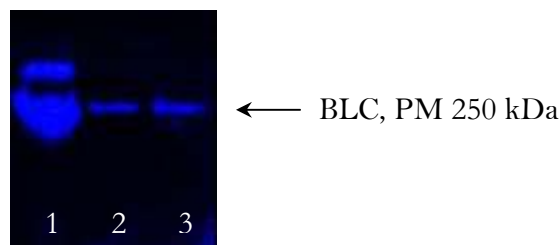


Figure II-15 : membrane PVDF de la BLC marquée après purifications successives. Puits 1 : après échange d'ions (EI) ; puits 2 : après EI et filtration sur gel (FG); puits 3 : après EI, FG et HPLC

II.3.2.b. Contrôle et amélioration du marquage associé à la protéine

Dans le même temps, l'absence de marquage quand la BLC et le sel sodique de l'acide phénylphosphinique sont mélangés sans ajout supplémentaire d'acide peracétique, nécessaire à la formation du radical, a été vérifiée. On constate que, malgré la carence en substrat, un faible signal radioactif est associé à la protéine. Cela représente un ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} = 1,4$, alors que le même ratio pour la réaction de marquage est égal à 32,2 (Figure II-16).

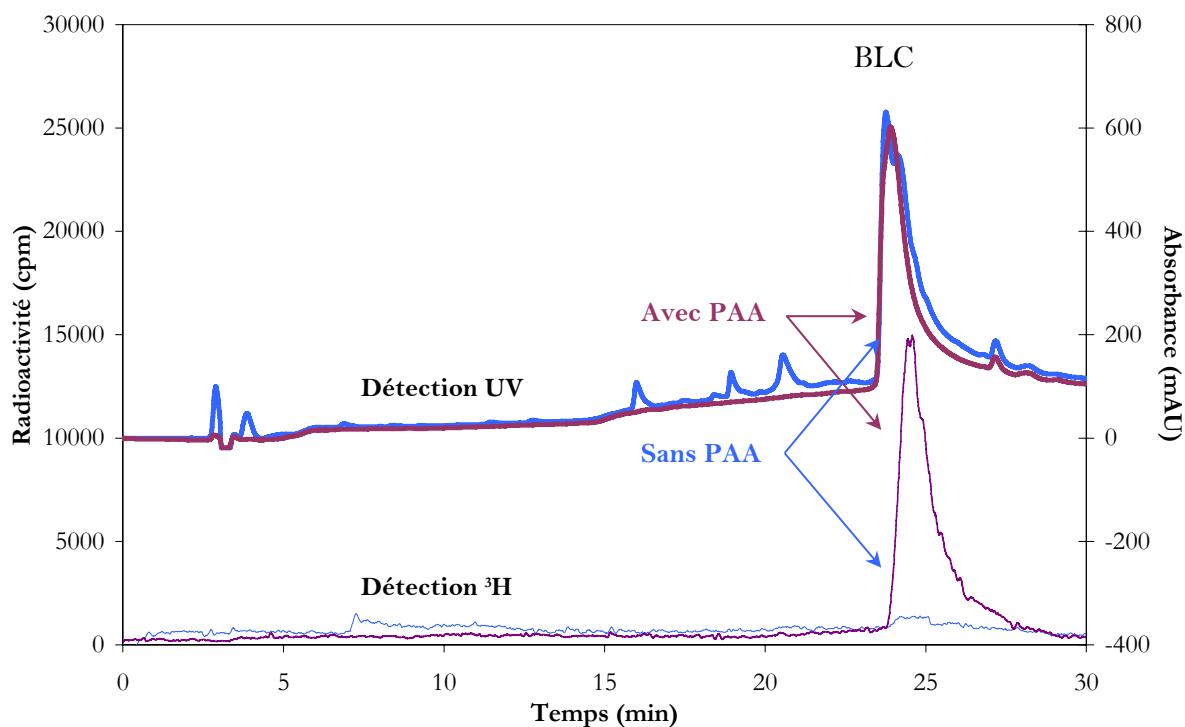


Figure II-16 : Chromatogramme de la BLC avec (trace violette) et sans acide peracétique (trace bleue) (10 éq. de PhPO_2TNa ($\text{AS } 340 \text{ GBq.mmol}^{-1}$), temps de réaction de 3 min)

Il en va de même pour l'imagerie, où du signal radioactif est détecté dans le témoin. Or, cette technique avait été choisie pour examiner les résultats de manière qualitative et obtenir les résultats de manière directe. Elle est donc par la suite abandonnée.

Une fois la méthode de purification optimisée, les conditions de marquage ont été modifiées afin d'augmenter l'incorporation en tritium au sein de la protéine (temps de réaction, nombre d'équivalents de composé phosphoré).

L'activité spécifique est estimée de manière indirecte par détermination de la quantité de BLC injectée par HPLC et de la radioactivité associée, en se référant à des courbes étalon (détaillées au chapitre V). Pour la BLC (tétramère), l'activité spécifique est évaluée à $370 \text{ GBq.mmol}^{-1}$, soit environ 91 GBq.mmol^{-1} par monomère.

Cette valeur semble être optimiste puisqu'elle signifie qu'une molécule tritiée (soit un tiers des molécules de vecteur) répare un radical sur 3,16 (nombre d'hèmes par tétramère).

D'autre part, la persistance du marquage dans le temps a été contrôlée. Il s'agit bien d'un phénomène irréversible (chapitre V).

✱ Augmentation du temps de réaction (10 éq. d'agent tritié)

En jouant sur le temps de réaction, on constate que plus il augmente, plus le signal

radioactif non spécifique croît, tandis que le marquage spécifique, lui, stagne (Tableau II-4).

Entrée	Temps de réaction (min)	Ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}}$		
		Sans PAA	Avec PAA (essai 1)	Avec PAA (essai 2)
1	5	2,0	14,6	10
2	10	6,7	16,9	12,2
3	20	5,0	14,5	7,4

Tableau II-4 : Incorporation calculée pour les expériences avec et sans témoin (10 éq. de PhPO₂TNa (AS 320 GBq.mmol⁻¹))

Lors de la réaction témoin, le composé phosphoré peut certainement interagir avec la protéine par interaction ionique et/ou hydrophobe, ou diffuser au sein de la protéine et rester piégé. On comprend bien dans ce cas que l'augmentation du signal non spécifique croisse avec le temps de réaction.

L'absence d'augmentation dans la réaction de marquage peut s'expliquer par le fait que le radical est créé et persiste à basse température. Il peut alors réagir avec le réducteur ajouté. Lorsque le temps de réaction augmente, la température au sein de l'échantillon s'élève également car celui-ci se décongèle lentement. Après cinq minutes, la solution est entièrement décongelée ; on peut donc conclure qu'augmenter le temps au-delà de cinq minutes est inutile, puisqu'il n'y a plus de radical en solution.

En conclusion, augmenter le temps de réaction nuit plutôt à l'amélioration des conditions de marquage, puisque d'une part, le signal non spécifique a plus d'ampleur que pour un temps de réaction plus court et d'autre part, le taux d'incorporation n'est pas amélioré.

✱ Augmentation du nombre d'équivalents d'agent tritié (3 min de réaction)

Ces expériences sont réalisées avec un agent tritié de moins forte activité spécifique que précédemment, expliquant la plus faible incorporation obtenue, avec des volumes croissants de solution (Tableau II-5). La modification du volume de solution de vecteur incorporée n'a pas d'influence sur la quantité de marquage incorporée dans la protéine (contrôlée au chapitre V).

Logiquement, la quantité de tritium incorporée est proportionnelle à la quantité de réducteur tritié ajoutée, même si on observe un ralentissement pouvant indiquer que l'on tend vers le maximum de réparation.

<i>Entrée</i>	<i>Nbre d'éq.</i>	<i>Ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}}$</i>		<i>AS (GBq. mmol⁻¹)</i>	
		Sans PAA	Avec PAA	Sans PAA	Avec PAA
1	5	nd	6,3 % (1)	nd	72
2	10	1,8 %	18,1% (3)	21	208
3	15	3,6 %	18,1 % (2)	41	208
4	20	nd	23,5 % (2)	nd	270

Tableau II-5 : Incorporation (moyenne de (x) expériences) calculée pour les expériences de marquage et du témoin correspondant, avec une quantité de vecteur variable (PhPO₂TNa d'AS 145 GBq.mmol⁻¹, temps de réaction de 3 min)

✖ Bilan

Les conditions optimales pour le marquage effectif de l'enzyme sont décrites dans le Tableau II-6.

<i>Temps de réaction</i>	<i>Nbre d'éq.</i>	<i>AS vecteur</i>
3 min	20	La plus haute possible

Tableau II-6 : récapitulatif des conditions opératoires optimales

II.3.3. Clivage de la protéine par la trypsine

Plusieurs digestions enzymatiques et chimiques de la BLC ont été réalisées afin d'identifier si les peptides contenant les deux tyrosines candidates Tyr259 et Tyr369 avaient incorporé du tritium. Les résultats obtenus avec la trypsine sont explicités ci-dessous puisque ce sont ceux qui ont donné les résultats les plus satisfaisants. Les autres digestions sont détaillées au chapitre V.

Le problème majeur rencontré avec l'utilisation de la trypsine est le nombre important de peptides formés (42 "théoriques"), donc une purification plus laborieuse. En revanche, la digestion de la protéine est complète.

✖ Attribution des peptides obtenus par spectrométrie de masse

L'analyse de la digestion peptidique par LC-MS permet de déterminer les peptides d'intérêt. Le peptide contenant Tyr369 issu d'un clivage parfait n'est pas trouvé. Par contre, on la trouve sous forme de traces dans un peptide plus long (Tableau II-7).

Entrée	M (g/mol)	Tyr	t _r (min)	Séquence peptidique
1	1285	259	79	LAHEDPDYGLR
2	1746	369	nd	LGPNYLQIPVNCPYR
3	2705	369	186	LGPNYLQIPVNCPYRARVANYQR

Tableau II-7 : détermination par LC-MS du temps de rétention des deux peptides d'intérêt.

✱ Expérience de marquage

Le chromatogramme de la digestion montre cette fois de nombreux pics actifs, à l'inverse du chromatogramme du témoin (i.e. BLC mélangée avec le composé tritié).

Le séquençage a été rendu possible grâce à la collaboration avec Robert Thai (CEA/Saclay/DSV/SIMOPRO).

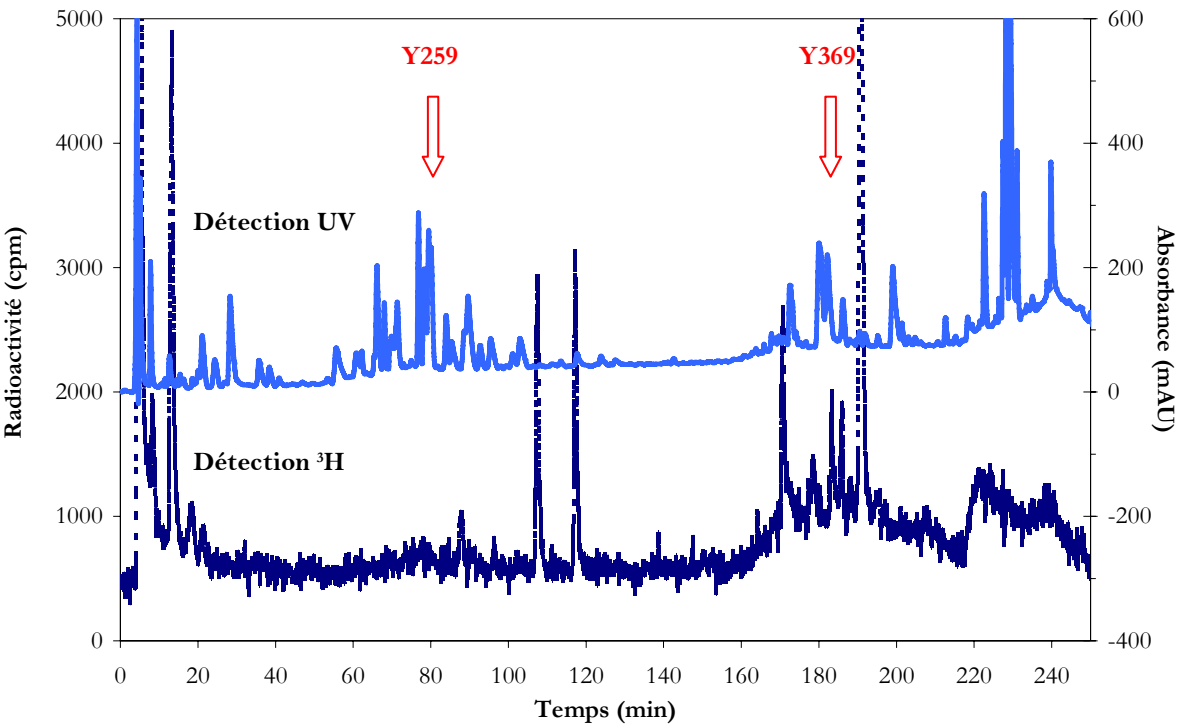


Figure II-17 : Chromatogramme de la BLC digérée par la trypsine (10 éq. de PhPO:TNa (AS 140

GBq.mmol⁻¹), temps de réaction de 3 min, ratio $\frac{Aire\ ^3H}{Aire\ UV} = 15,7$)

Les zones correspondant à de la radioactivité sur le chromatogramme ont été collectées puis séquencées par séquençage automatique d'Edman ainsi que le peptide contenant Tyr259, bien qu'il n'y ait pas de marquage associé au pic UV (Figure II-18).

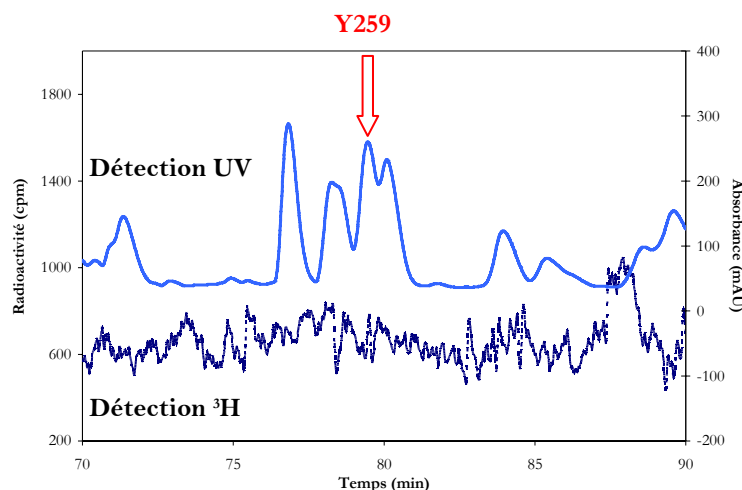


Figure II-18 : absence de marquage sur le peptide contenant Tyr259 (10 éq. de PhPO_2TNa (AS 140

GBq.mmol^{-1}), temps de réaction de 3 min, ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} = 15,7$)

Une expérience contenant cinq fois plus d'enzyme et deux fois plus d'équivalents de composé phosphoré a conduit à la même conclusion : dans les conditions de réaction, il n'y a pas de radioactivité incorporée dans le peptide contenant Tyr259. Ce dernier a tout de même été séquencé, et le comptage des acides aminés par scintillation a également donné un résultat négatif.

Pour Tyr369, les résultats sont plus contrastés. Pour la même série d'expériences que précédemment, les pics à $t_R=182$ et 186 min (Figure II-19) ont été séquencés (dix premiers résidus) et dans chacun des cas, des traces du peptide d'intérêt ont été détectées (Figure II-19, A). En revanche, le comptage n'a rien donné de significatif.

Ces résultats ont été retrouvés de manière qualitative dans une expérience à plus grande échelle (Figure II-19, B). Les pics à 60, 64 et 66 minutes (modification du gradient HPLC utilisé) ont été collectés et séquencés. Du peptide contenant Tyr369 est également retrouvé dans les trois fractions, en mélange (60 min, 64 min) ou seul (66 min). Aux deux premiers temps, on ne retrouve pas de radioactivité associée à la tyrosine lors du comptage des solutions d'acides aminés. Pour le dernier, les acides aminés n'ont pu être collectés faute de matériel, mais on retrouve des traces de radioactivité importantes dans les fractions de lavage entre chaque cycle.

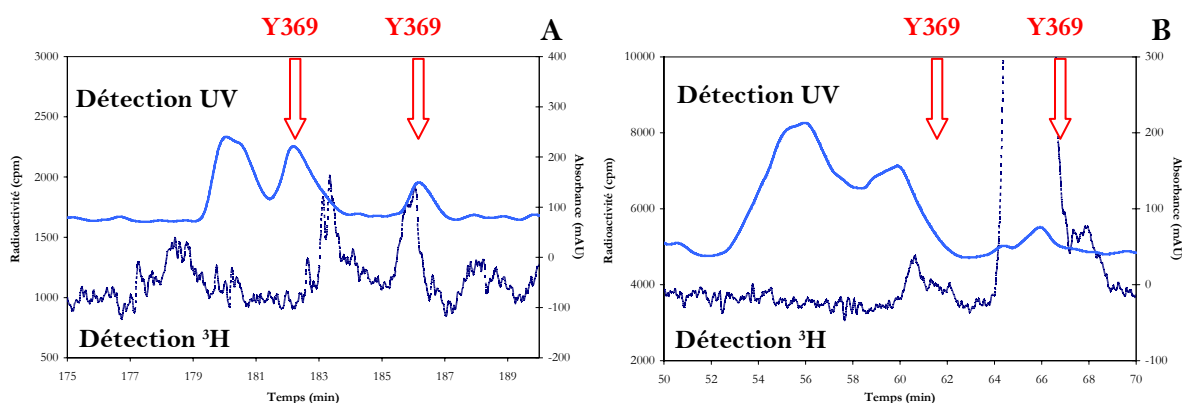


Figure II-19 : marquage associé au peptide contenant Tyr369 (10 éq. de PhPO_2TNa (AS 140 GBq.mmol $^{-1}$),

ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} = 15,7$ à gauche ; 20 éq. de PhPO_2TNa (AS 140 GBq.mmol $^{-1}$), ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} = 18,1$ à droite ;
temps de réaction de 3 min)

La présence de nombreux pics actifs ne correspondant pas à un peptide peut s'expliquer par la chimie de l'espèce radicalaire créée à la suite de l'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ (Schéma II-8). Le radical phosphinoylé peut s'additionner sur les doubles liaisons ou les fonctions carbonyle pour créer des radicaux carbocentrés.²³

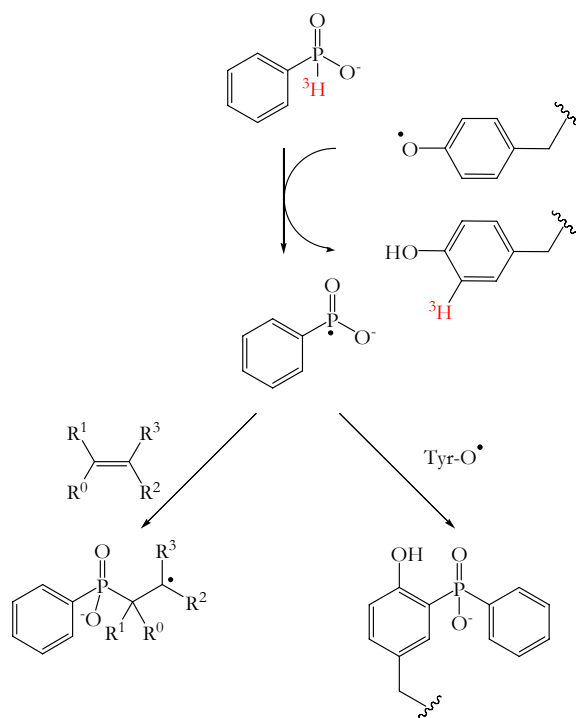


Schéma II-8 : réactions du radical phosphocentré avec les composés riches en électrons

Ceux-ci peuvent arracher des atomes d'hydrogène sur les acides aminés, qui seront ensuite réparés par le composé phosphinique tritié. Cela a pour conséquence que du marquage peut être observé sur des acides aminés qui ne sont pas impliqués dans le transfert électronique. Néanmoins, ce phénomène reste plutôt confidentiel puisqu'un nombre très restreint de

peptides est associé à un signal radioactif.

Le radical centré sur le phosphore peut, lui, se recombinaison avec des radicaux aromatiques, modifiant ainsi le peptide formé qui *a priori* est non actif et possède des caractéristiques chromatographiques légèrement différentes du peptide intact. Cela peut aussi expliquer la faible quantité de peptide contenant Tyr369 détectée.

Après ces essais de marquage prometteurs, mais difficiles à analyser, nous avons cherché à améliorer l'incorporation en augmentant l'activité spécifique de l'agent tritié, puisque celui utilisé dans ces expériences préliminaires étaient de 140 GBq.mmol⁻¹ (les solutions à plus haute activité spécifique utilisées pour la mise au point des expériences de marquage sur la protéine n'étaient plus disponibles).

Une autre voie de clivage de la protéine a dans le même temps été expérimentée afin d'obtenir le peptide contenant Tyr369 en plus grande quantité.

II.3.4. Autoradiolyse de la solution de vecteur

Les essais de marquage avec un agent à plus haute activité spécifique ont été entrepris avec le composé tritié à 480 GBq.mmol⁻¹, juste après sa synthèse.

Devant l'échec de la réaction de marquage avec ce vecteur, réitéré avec un autre lot d'agent tritié fraîchement synthétisé, l'analyse chromatographique de différentes solutions de vecteur a été entreprise. Il apparaît que les solutions utilisées pour les réactions de marquage montrent une forte propension à se dégrader (Figure II-20).

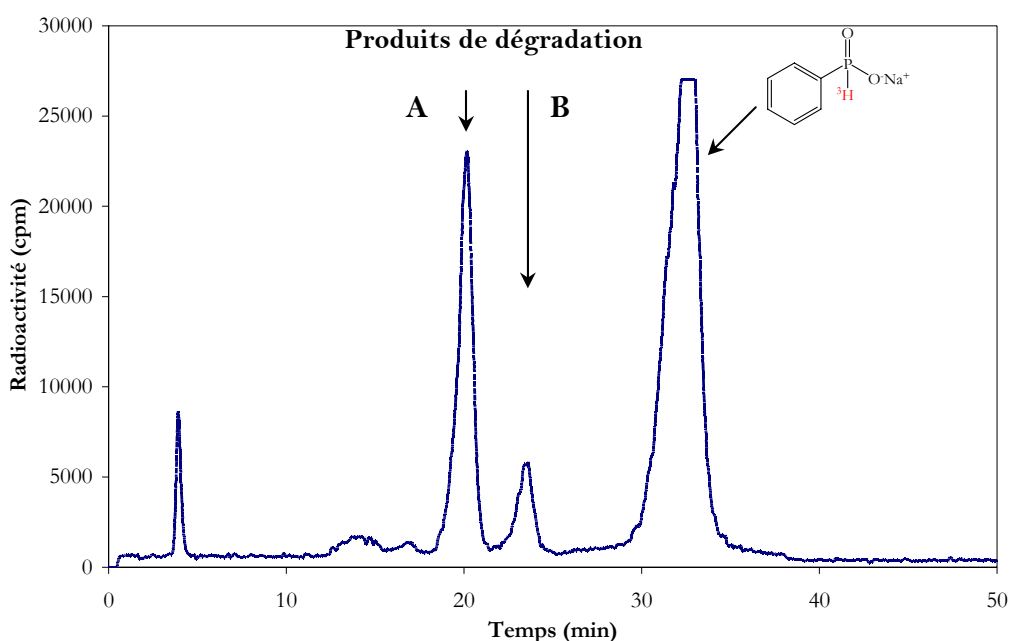


Figure II-20 : Analyse de la dégradation du sel de l'acide phénylphosphinique par HPLC (échange d'ions)

Les différents composés observés ont été isolés par chromatographie d'échange d'anions, dessalés sur colonne C18, puis la réaction de marquage a été effectuée avec chacun d'entre eux.

Le Tableau II-8 regroupe les résultats obtenus pour les réactions de marquage menées à quantité de radioactivité égale ($3,34 \times 10^3 \text{ GBq}$) pour les composés de radiolyse A et B et le sel de l'acide phénylphosphinique (cela représente 10 éq. à 43 GBq.mmol^{-1})

<i>Composé</i>	<i>t_r (min)</i>	$\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} \text{ marquage}$	$\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} \text{ témoin}$
A	20,2	6,6	0,8
B	23,7	5,8	0,8
PhPO ₂ ³ HNa	32,8	1,0	0,7

Tableau II-8 : comparaison du marquage obtenu sur la BLC pour les trois produits purifiés (temps de réaction de 3 min)

A l'examen des résultats obtenus, il a été conclu que ce n'est pas le sel de l'acide phénylphosphinique lui-même qui transfère l'atome de tritium mais ses deux composés de radiolyse majoritaires.

La détermination par RMN de la structure des produits radiolysés ne fut pas possible en raison des quantités de produits disponibles. La spectrométrie de masse a montré la formation d'un produit à $M+1 = 158$ (acide phénylphosphinique + [O]), qui pourrait correspondre à de l'acide phénylphosphonique et d'un produit à $M+1 = 175$ (acide phénylphosphinique + 2 [O]). Cependant, s'il s'agissait d'une forme oxydée du phosphore telle que l'atome de tritium fourni soit lié à un oxygène, il y aurait dilution isotopique dans le milieu en raison de la labilité de la liaison O-³H. Nous pouvons donc exclure ce type de composés, mais ces analyses ne permettent pas d'argumenter suffisamment pour proposer une structure intéressante.

II.4. Conclusions et Perspectives

II.4.1. Bilan des expériences

Les expériences de RPE semblent montrer que la réaction entre le sel de l'acide phénylphosphinique et le radical tyrosyle conduit à la diminution du signal du radical. La transposition de ces résultats au marquage par le tritium du résidu impliqué lors de l'ajout d'acide péricétique sur la BLC montre une incorporation nette et irréversible de tritium dans

la protéine. Lors du clivage de la BLC, de la radioactivité est toujours détectée sur les chromatogrammes. Cependant, l'analyse *in fine* par séquençage ne permet pas d'accéder à des quantités suffisantes de peptides pour détecter une quelconque radioactivité sur les acides aminés incriminés.

Même s'il semble que c'est Tyr369 qui, par cette méthode, est le site de formation du radical, les résultats ne sont pas suffisamment concluants pour pouvoir l'affirmer de manière définitive.

II.4.2. Utilisation de 2-nitro-thiocyanobenzoate (NTCB)

Les résultats issus de la digestion par la trypsine n'ayant pas été très probants, une méthode alternative de clivage de la BLC utilisant le NTCB a été développée. Ce réactif chimique permet de cliver la chaîne peptidique sur les cystéines réduites. Le peptide (de 145 acides aminés) contenant les deux tyrosines à étudier est détecté par spectrométrie de masse.

Le marquage de la protéine suivi du clivage *via* le NTCB donne le chromatogramme de la Figure II-21. Le peptide recherché est élué dans une zone où du marquage est observé.

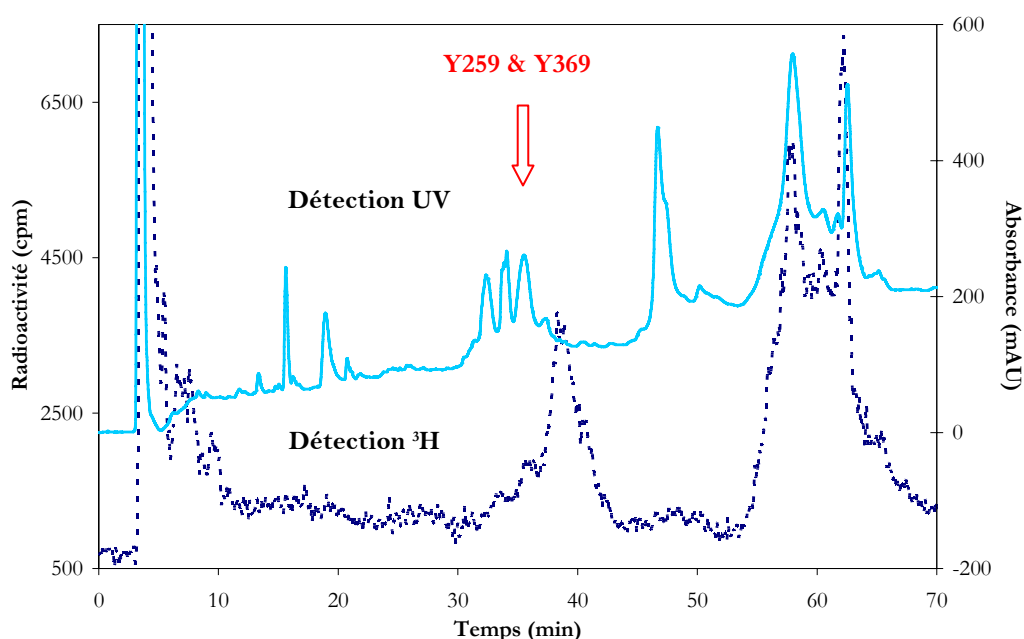


Figure II-21 : Chromatogramme de la BLC clivée par le NTCB (10 éq. de PhPO:TNa, AS 355 GBq.mmol⁻¹,

$$\text{ratio } \frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} = 15,0 ; \text{ temps de réaction de 3 min)}$$

Il en découle que cette méthode permet de faciliter considérablement la purification en collectant uniquement le peptide d'intérêt qui donne accès aux deux tyrosines. Par clivage ultérieur à développer, suivi de la purification et séquençage des peptides ainsi obtenus, on

devrait accéder à l'information sur les deux tyrosines.

Mais auparavant, il faut améliorer la technique de marquage. Etant donnée la faible quantité de radioactivité portée par ce peptide, on doute fortement que l'on arrivera à trouver de la radioactivité sur les acides aminés après séquençage.

C'est donc cette méthode alternative de coupure de la BLC qui devra être la voie la plus judicieuse d'obtention des peptides dans les expériences à venir.

II.4.3. Changement de vecteur

L'actuel agent a montré ses limitations sur le système étudié. On ne connaît pas la structure du composé qui fait office de réparateur. Celui qui est synthétisé n'est pas capable de transférer un atome de tritium sur les tyrosines par réaction avec les radicaux apparaissant lors de la réaction de la BLC avec l'acide peracétique.

On peut relier ce résultat au fait qu'au laboratoire, Guillaume Mousseau, lors de la détermination de l'échelle de réactivité des acides aminés vis-à-vis du même vecteur avec $\bullet\text{OH}$ comme source de radicaux, avait démontré que la tyrosine incorporait peu de tritium.²⁴

C'est pourquoi nous avons préféré mettre en suspens les travaux sur la protéine pour trouver un agent de réparation plus apte à réparer les radicaux aromatiques.

Ce travail de recherche de nouveaux réducteurs capables de réagir selon un mécanisme radicalaire pour libérer un atome d'hydrogène, ainsi que leur synthèse et leur utilisation à la fois sur la BLC et sur la tyrosine seule, fait l'objet du chapitre III.

Bibliographie du chapitre II

- ¹ J. Switala, P. C. Loewen, Diversity of properties among catalases, *Arch. Biochim. Biophys.* **2002**, *401*, 145-154.
- ² W. A. Schroeder, J. R. Shelton, J. B. Shelton, B. Robberson, G. Apell, R. S. Fang, J. Bonaventura, The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase, *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *214*, 397-421.
- ³ I. Fita, M. G. Rossmann, The active center of catalase, *J. Mol. Biol.* **1985**, *185*, 21-37.
- ⁴ M. R. Murthy, T. J. Reid 3rd, A. Sicignano, N. Tanaka, M. G. Rossmann, Structure of beef liver catalase, *J. Mol. Biol.* **1981**, *152*, 465-499.
- ⁵ I. Fita, A. M. Silva, M. R. N. Murthy, M. G. Rossmann, The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution, *Acta Cryst. B* **1986**, *42*, 497-515.
- ⁶ H. N. Kirkman, G. F. Gaetani, Catalase: A Tetrameric Enzyme with Four Tightly Bound Molecules of NADPH, *PNAS* **1984**, *81*, 4343-4347.
- ⁷ C. D. Putnam, A. S. Arvai, Y. Bourne, J. A. Tainer, Active and Inhibited Human Catalase Structures : Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism, *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 295-309.
- ⁸ G. Avigad, D. Amaral, C. Asensio, B. L. Horecker, The d-Galactose Oxidase of *Polyporus circinatus*, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2736-2743.
- ⁹ A. Deisseroth, A. L. Dounce, Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role, *Physiol. Rev.* **1970**, *50*, 319-375.
- ¹⁰ H. N. Kirkman, S. Galiano, G. F. Gaetani, The function of catalase-bound NADPH, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 660-666.
- ¹¹ P. Andreoletti, S. Gambarelli, G. Sainz, V. Stojanoff, C. White, G. Desfonds, J. Gagnon, J. Gaillard, H. M. Jouve, Formation of a Tyrosyl Radical Intermediate in *Proteus mirabilis* Catalase by Directed Mutagenesis and Consequences for Nucleotide Reactivity, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13734-13743.
- ¹² M. J. Benecky, J. E. Frew, N. Scowen, P. Jones, B. M. Hoffman, EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11929-11933.
- ¹³ A. Ivancich, H. M. Jouve, J. Gaillard, EPR Evidence for a Tyrosyl Radical Intermediate in Bovine Liver Catalase, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12852-12853.
- ¹⁴ A. Ivancich, H. M. Jouve, B. Sartor, J. Gaillard, EPR Investigation of Compound I in *Proteus mirabilis* and Bovine Liver Catalases: Formation of Porphyrin and Tyrosyl Radical Intermediates, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9356-9364.
- ¹⁵ M. T. Green, The Structure and Spin Coupling of Catalase Compound I: A Study of Noncovalent Effects, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9218-9219.
- ¹⁶ A. Ivancich, Conversation personnelle, **2005**.
- ¹⁷ A. Ivancich, T. A. Mattioli, S. Un, Effect of Protein Microenvironment on Tyrosyl Radicals. A High-Field (285 GHz) EPR, Resonance Raman, and Hybrid Density Functional Study, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5743-5753.
- ¹⁸ C. T. Farrar, G. J. Gerfen, R. G. Griffin, D. A. Force, R. D. Britt, Electronic Structure of the Y_D Tyrosyl Radical in Photosystem II: A High-Frequency Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopic and Density Functional Theoretical Study, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 6634-6641.
- ¹⁹ C. Berthomieu, R. Hienerwadel, Vibrational spectroscopy to study the properties of redox-active

tyrosines in photosystem II and other proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1707, 51- 66.

- ²⁰ J. Stubbe, W. A. van der Donk, Protein Radicals in Enzyme Catalysis, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 705-762.
- ²¹ G. J. Gerfen, B. F. Bellew, S. Un, J. M. Bollinger, J. Stubbe, R. G. Griffin, D. J. Singel, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6420-6421.
- ²² D. A. Svistunenko, C. E. Cooper, A New Method of Identifying the Site of Tyrosyl Radicals in Proteins, *Biophys. J.* **2004**, 87, 582-595.
- ²³ T. Majima, W. Schnabel, W. Weber, Phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinates as water-soluble photoinitiators. Generation and reactivity of $O=P(C_6H_5)(O\cdot)$ radical anions, *Macromol. Chem. Phys.* **1991**, 192, 2307-2315.
- ²⁴ O. P. Thomas, G. Mousseau, S. Oppillart, A. Coirier, A. Salcedo-Serna, R. Thai, F. Beau, J. P. Renault, S. Pin, J. C. Cintrat, B. Rousseau, Localization and Quantification of Carbon-Centered Radicals on Any Amino Acid of a Protein, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 5444-5448.

Chapitre III. Conception et synthèse de composés réducteurs. Application au transfert d'hydrogène au radical tyrosyle de la catalase de foie de bœuf

Après les résultats obtenus pour le marquage du site actif de la BLC utilisant le sel de l'acide phénylphosphinique tritié, nous nous sommes tournés vers la littérature pour déterminer quelle devait être la structure de notre nouveau vecteur hydrosoluble pour réagir avec le radical tyrosyle en insérant un atome de tritium, tout en étant stable dans les conditions de réaction.

Les composés d'intérêt possèdent la capacité à transférer un atome d'hydrogène à un radical aryle par un processus radicalaire. Ce sont des substances soit contenant des hétéroatomes liés à un atome d'hydrogène, soit possédant une liaison C-H activée.

Une fois les composés choisis en fonction des caractéristiques qu'ils doivent afficher (solubilité et stabilité en milieu aqueux, liaison X-³H non labile à pH physiologique, synthèse facilement transposable au tritium, vitesse de réaction avec les radicaux aromatiques adaptée), ceux disponibles commercialement ont été achetés, les autres synthétisés au laboratoire.

Ensuite, nous avons entrepris des essais sur la BLC par spectroscopie RPE pour suivre la diminution du signal du radical tyrosyle et par spectrophotométrie UV-visible afin d'observer la formation des différents composés intervenant dans la catalyse. Puis, dans la partie IV, nous détaillerons les expériences de radiolyse entreprises sur la tyrosine afin de déterminer la réactivité de l'acide aminé vis-à-vis des différentes structures choisies.

I. Composés polaires ou hydrosolubles capables de réduire un radical aromatique

La discussion portera, quand cela est possible, sur des molécules réductrices hydrosolubles. Les molécules citées ci-dessous ont pour caractéristique commune une liaison d'énergie relativement faible entre l'atome d'hydrogène qui est transféré et l'atome adjacent.

D'autre part, les données cinétiques accessibles pour la réaction entre radicaux aryles et réducteurs sont peu nombreuses. C'est pourquoi on donne également des informations sur les radicaux alkyles pour déterminer un ordre de grandeur de la réactivité globale des réducteurs.

I.1. Hydrures d'étain

I.1.1. Généralités

Fortement utilisés en chimie radicalaire ces quarante dernières années, les hydrures d'étain sont en passe d'être remplacés par des réducteurs moins chers, moins toxiques, et plus facilement purifiables. Leur toxicité les empêche en effet d'être utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. Composés très apolaires, ils sont difficiles à séparer des composés apolaires obtenus et ne sont pas généralement solubles dans l'eau.

Depuis 1990, des exemples d'organostannanes plus polaires que l'hydrure de tributyle étain, voire hydrosolubles, ont été synthétisés.

Le composé **1** (Figure III-1) dans lequel l'étain est lié à une pyridine, possède des qualités réductrices équivalentes à $n\text{-Bu}_3\text{Sn-H}$ (force de liaison de 76 kcal.mol^{-1}). Son avantage majeur par rapport à celui-ci est que le dérivé stannylé halogéné formé est bien plus polaire que les dérivés tributyle ou triphényle correspondants, rendant son élimination plus facile.¹ Dans les hydrures d'étain **2** et **3**, le transfert d'hydrure est activé intramoléculairement par la présence du doublet nucléophile de l'azote, permettant à **2** de réduire les cétones² et rendant **3** hautement réactif vis-à-vis des composés halogénés.³ Les produits secondaires sont susceptibles d'être éliminés plus facilement.

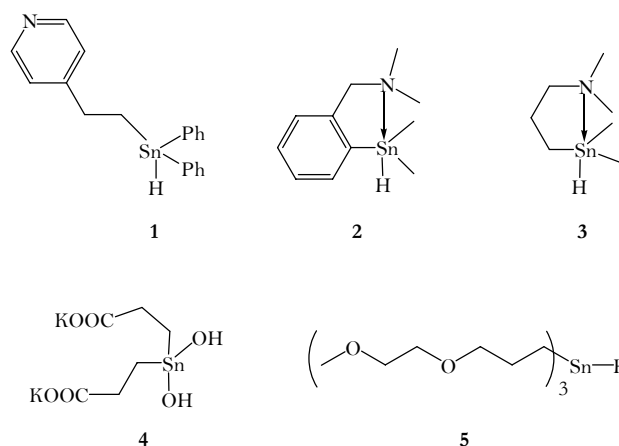


Figure III-1: Hydrures d'étain polaires ou hydrosolubles

Les composés stannylés hydrosolubles **4** et **5** ont montré leur capacité à effectuer des réductions et des cyclisations en milieu aqueux.^{4,5} L'hydroxyde **4** doit être utilisé en conjonction avec NaBH_4 en solution alcaline. Mais sa liaison O-H labile empêche son utilisation en marquage isotopique. L'intérêt de l'hydrure tris[3-(2-méthoxyéthoxy)-propyl]-stannane **5** synthétisé par Breslow est de pouvoir effectuer des réactions en milieu aqueux, ce qui le rend intéressant pour des études bioorganiques. Giese *et coll.* ont effectivement décrit la

réparation *in vitro* d'un radical formé sur un sucre de l'ADN par le glutathion et ce dérivé stannylé avec la même sélectivité et des cinétiques proches.⁶

Cependant, ce genre de composés n'est pas très stable et doit être rapidement utilisé après préparation.

I.1.2. Données cinétiques

La constante de vitesse pour la réaction entre des radicaux aryles et $n\text{-Bu}_3\text{Sn-H}$ ainsi que l'effet isotopique du deutérium sur celle-ci ont été mesurés comme étant égaux à $k_H = 7,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_D = 5,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.^{7,8}

I.2. Hydrures de germanium

I.2.1. Généralités

Le seul composé à base de germanium décrit comme étant capable d'effectuer des réactions en milieu aqueux est l'hydruure de tri(2-furyl)germane **6** (Figure III-2), mais, contre toute attente, il s'avère ne pas être hydrosoluble. En revanche, il a démontré sa capacité à réduire en milieu aqueux des halogénures organiques en présence d'un initiateur radicalaire.⁹

L'effet électro-attracteur du groupement furane par rapport à un groupement phényle ou alkyle diminue la force de liaison entre Ge et H. Cela augmente ainsi le pouvoir réducteur du composé, soit sa facilité à transférer un atome d'hydrogène, de surcroît vers un radical carbocentré riche en électron. La synthèse de composés similaires avec de l'étain est assez difficile en raison de leur instabilité.¹⁰

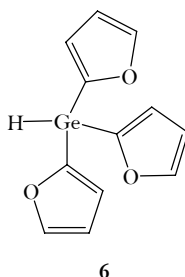


Figure III-2 : Hydruure de tri(2-furyl)germane

I.2.2. Données cinétiques

Les données cinétiques relatives montrent que la cinétique de transfert d'hydrogène est dans le cas de Bu_3GeH trois fois inférieure à Bu_3SnH vis-à-vis des radicaux aryles ($k = 2,6 \times 10^8$

$\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et dix sept fois inférieure vis-à-vis des radicaux alkyles.^{11,12}

I.3. Hydrures de silicium

I.3.1. Généralités

Les liaisons Si-H dans les triorganosilanes sont trop fortes pour permettre le transfert d'hydrogène. Les données cinétiques relatives à l'arrachement d'un hydrogène d'un radical carbo-centré par un silane trialkylé montrent qu'en général cette réaction n'est pas favorisée à température ambiante. Elle nécessite une grande quantité d'amorceur, de hautes températures ou la présence de thioalcane en quantité catalytique.¹³

Le tris(triméthylsilyl)silane est de tous les silanes celui qui offre la meilleure alternative à l'utilisation d'hydrures d'étain, car la liaison Si-H est seulement de 5 kcal.mol^{-1} plus forte que Sn-H. Seulement il est pyrophorique, donc non-utilisable dans les conditions de réaction de la BLC (formation d'oxygène).¹⁴

Les arylsilanes hydrosolubles **7** et **8** (Figure III-3) ont été utilisés pour déshalogéner à température ambiante et ont montré une meilleure activité en milieu aqueux qu'en milieu organique.¹⁴ Il peut être intéressant de s'inspirer de la synthèse des chaînes latérales pour concevoir un agent à base d'étain ou de germanium.

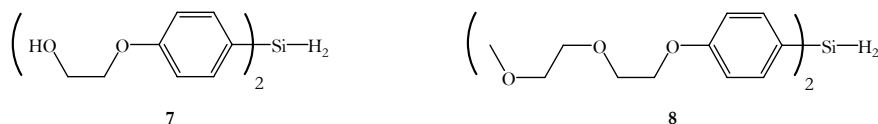


Figure III-3 : Hydrures de silicium hydrosolubles

I.3.2. Données cinétiques

La constante de vitesse de la réaction d'échange d'hydrogène entre R_3SiH et un radical alkyle primaire est plus grande quand $\text{R}=\text{Me}_3\text{Si}$ ($7,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ à 50°C) que quand $\text{R}=\text{Ph}$ ($4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ à 110°C) ou $\text{R}=\text{alkyl}$ ($k=3,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ à 80°C).

I.4. Cyclohexadiènes

I.4.1. Généralités

Les cyclohexa-1,4-diènes **9** possèdent des liaisons C-H dont la force est de l'ordre de grandeur de celle de Sn-H (76 kcal.mol^{-1} et 78 kcal.mol^{-1} resp.). L'activation de ces liaisons

vient du fait qu'elles sont en position bis-allylique. Contrairement à la plupart des composés organiques dont la liaison C—H est forte, rendant ainsi l'arrachement d'un hydrogène tout à fait non sélectif, c'est l'hydrogène bis-allylique dans ces composés qui est arraché préférentiellement.¹⁵

Ces composés sont dits pro-aromatiques. La perte d'un atome d'hydrogène conduit à un radical neutre stabilisé par résonance, qui, en expulsant un substituant, restaure l'aromaticité du cycle (Schéma III-1). Ce type de molécules est synthétisé par réduction/alkylation de Birch. Pour une transposition au tritium, la synthèse débiterait donc par l'incorporation de l'atome radioactif, compliquant la synthèse.

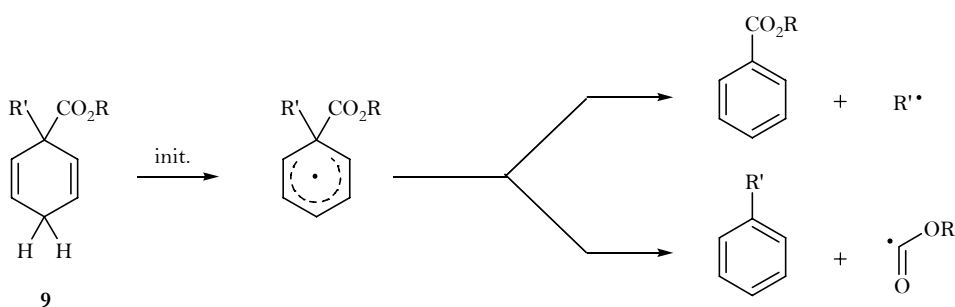


Schéma III-1 : caractère pro-aromatique des composés cyclohexadiènes

I.4.2. Données cinétiques

Peu de données cinétiques sont disponibles, mais globalement, la vitesse d'arrachage de l'atome d'hydrogène par un radical primaire pour cette famille de molécules est du même ordre de grandeur que pour Bu_3GeH ou plus faible selon le substituant sur le cycle aromatique. Elle peut varier en fonction des substituants et de la nature du radical initiateur de $0,003$ à $540 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à température ambiante.¹⁶

I.5. Thiols

En général, les radicaux thiyle ne sont pas capables de propager des réactions radicalaires. C'est pourquoi ils sont utilisés en quantité catalytique en association avec des silanes.¹⁷ Pourtant, ils peuvent réparer des radicaux carbocentrés aromatiques, à l'instar du DTT, et sont utilisés *in vivo* par les enzymes (cf. chapitre I).^{18,19} Cependant, la liaison S—H est trop labile pour empêcher l'utilisation de thiols en tant que marqueur radioactif, puisqu'il faudrait réaliser toutes les procédures de marquage dans de l'eau tritiée à très haute activité volumique (de l'ordre de $1,2 \times 10^5 \text{ GBq} \cdot \text{mL}^{-1}$!), ce qui pose des problèmes environnementaux et de radioprotection évidents en plus du coût de la manipulation.

I.6. Composés phosphorés

I.6.1. Généralités

Les composés phosphorés sont également de très bons substituts à l'étain. La chimie de ces réducteurs a été intensivement étudiée pour permettre toutes sortes de transformations chimiques.

Les travaux de Barton utilisent des phosphites de dialkyles **10** hydrosolubles pour la désoxygénation d'alcools avec des constantes de vitesses mesurées à 30°C de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ sur des radicaux alkyles primaires.^{20,21}

L'acide hypophosphoreux H_3PO_2 a été utilisé comme agent réducteur pour la déhalogénéation en milieu aqueux.²² Murphy *et coll.* ont montré la capacité de l'éthylpipéridine hypophosphite **11** et l'oxyde de diéthylphosphine **12** à effectuer la préparation d'indolones^{23,24} et une cyclisation de diènes.²⁵ L'éthylpipéridine hypophosphite-*d* a même permis l'introduction d'un deutérium sur un cycle aromatique par échange $^1\text{H}/^2\text{H}$.

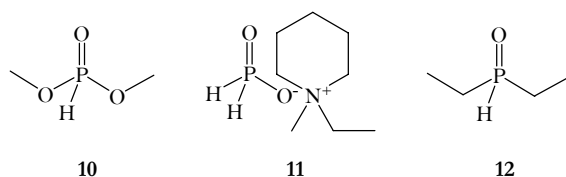


Figure III-4 : Réducteurs phosphorés

I.6.2. Données cinétiques

La constante de vitesse absolue de réaction du phosphite de diméthyle avec le radical phényle a été estimée à $1,05 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.²⁶

I.7. Autres exemples

D'autres systèmes plus exotiques ont également été développés, parmi lesquels on peut citer les phosphines ligandées par des borates, comme $\text{Bu}_3\text{P} \rightarrow \text{BH}_2\text{Ph}$, utilisées dans la déhalogénéation, désoxygénation ou addition sur une double liaison.¹⁴

On trouve également dans la littérature des données sur les réductions par certains organométalliques, dont les énergies de liaisons M-H sont typiquement de l'ordre de 60 kcal.mol⁻¹.²⁷ Les complexes contenant ces métaux de transition peuvent être des hydrures de gallium HGaCl_2 ,²⁸ d'indium HInCl_3 , utilisé seul²⁹ ou en tandem avec NaBH_4 ,³⁰ ou le réactif de

Schwartz, $\text{Cp}_2\text{Zr}(\text{H})\text{Cl}$, utilisé dans les réactions de cyclisations radicalaires.³¹ Cependant, ces composés sont sensibles à l'humidité et ont tendance à être très réactifs, notamment vis-à-vis des doubles liaisons où le transfert de H^\bullet est direct, donc ne nécessitant pas ainsi d'amorceur radicalaire.

I.8. Cas du NADPH

Le rôle du NADPH *in vivo* est d'effectuer des réductions par transfert global d'hydrure (soit directement, soit par transfert successif e^- , H^+ , e^-). Même si cette hypothèse est discutée, il a été proposé comme étant le cofacteur naturellement utilisé par les enzymes intervenant dans la réduction du composé II en Fe(III), notamment pour les catalases (cf. chapitre II).³² Ce n'est pas un réducteur à un seul électron comme précédemment mais à deux.

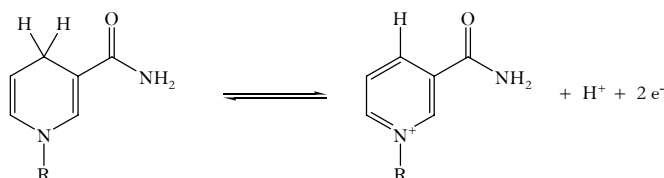


Schéma III-2 : formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

L'énergie de dissociation hétérolytique de la liaison C-H est estimée, par calcul théorique, égale à 64 kcal.mol^{-1} pour $\text{R}=\text{Bz}$, montrant ainsi que ce réducteur est un excellent donneur d'hydrure. L'énergie de dissociation homolytique, elle, est de l'ordre de 68 kcal.mol^{-1} , confirmant également la capacité de ce type de molécule à transférer un atome d'hydrogène.³³ Sur la base des données obtenues *in silico* sur les énergies de liaisons, on ne peut discriminer, entre le transfert d'hydrure ou d'un atome d'hydrogène, lequel sera le processus majoritaire.

Beaucoup d'auteurs ont débattu sur ce sujet. Le transfert d'hydrure a été observé pour la réaction entre un analogue du NADPH et composés de la famille des flavines³⁴ tandis que le processus de transferts successifs $[\text{e}^-, \text{H}^+, \text{e}^-]$ a été observé par réaction avec $\text{Fe}(\text{bpy})_3^{3+}$ et $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ($\text{bpy} = 2,2'$ -bipyridine),³⁵ avec les ions *N*-méthylacridinium³⁶ ou des trifluoroacétophénonnes substituées.³⁷

I.9. Conclusions : choix des molécules

Afin de déterminer quelle est l'entité la plus apte à transférer un atome d'hydrogène sur le radical tyrosyle de la BLC, nous avons choisi un échantillon de molécules possédant soit un hétéroatome, soit une structure particulière décrite auparavant, qui soient compatibles avec notre cahier des charges. Les composés à tester choisis sont regroupés dans le Tableau III-1.

Entrée	Composé	N°	Formule
1	Acide 4-méthoxy-phénylphosphinique	13	
2	Oxyde de diphénylphosphine	14	
3	Phosphite de diméthyle	10	
4	2,4-diméthoxycyclohexadiène	15	
5	N-méthyl nicotinamide	16	
6	Hydrure de trifurylgermane	6	
7	Hydrure de tris[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane	17	
8	Hydrure de tris[3-(2-méthoxyéthoxy)propyl]stannane	5	

Tableau III-1 : Liste des composés choisis pour la capture du radical tyrosyle de la BLC

Ainsi, nous avons focalisé notre recherche d'un nouvel agent de marquage sur les hydrures d'étain et de germanium, les cyclohexadiènes et les composés phosphorés. Une structure de type cyclohexadiène (**15**), un analogue du NADPH (**16**) et tous les composés phosphorés choisis sont disponibles commercialement. En revanche, les hydrures d'étain et de germanium "hydrosolubles" doivent être synthétisés. Leur préparation fait l'objet de la partie suivante.

II. Synthèse de composés organométalliques

II.1. Synthèse de l'hydrure de trifurylgermane

La synthèse du trifurylgermane a été décrite pour la première fois par Gevorgyan *et*

coll. en 1985, par réduction de BrGeFu_3 , obtenu à partir de GeBr_4 , *via* LiAlH_4 dans des conditions de transfert de phase pour éviter des réactions secondaires de polycondensation.³⁸

L'équipe d'Oshima a ensuite revisité la formation de l'hydruire. C'est cette procédure simple et rapide que nous avons suivie.³⁹

En premier lieu, on forme l'organolithien dérivé du furane, qui ensuite réagit sur le tétrachlorure de germanium. La réaction aboutit au tétrafuryl germane **18**. Ensuite, la réduction par le lithium forme l'hydruire **6** voulu, avec un rendement de 40%.

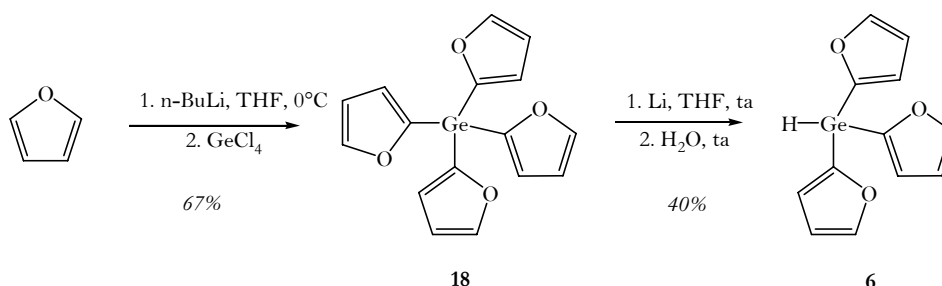


Schéma III-3 : synthèse du tri-(2-furyl)germane

L'huile translucide obtenue est conservée sous argon à -20°C et s'avère être relativement stable pendant plusieurs mois dans ces conditions de stockage. En revanche, elle n'est pas soluble dans l'eau.

II.2. Synthèse des hydrures d'étain

Deux synthèses d'hydrures d'étain hydrosolubles ont été entreprises pour diversifier le motif accroché sur l'étain.

II.2.1. Synthèse du tris[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane

Cette molécule n'est pas décrite dans la littérature, mais un analogue hydrosoluble à base de silicium a été synthétisé par Yamazaki *et al.*¹⁶ La synthèse de ce dernier a donc été transposée à la préparation du composé **17** (Schéma III-4).

La première étape consiste en la formation d'un éther *via* la réaction de Williamson entre le 4-bromo-phénol et le 2-bromoéthyleméthyle éther. On forme ensuite le magnésien du composé **19**, puis l'ajout de SnCl_4 fournit la poudre blanche **20**. La réaction stœchiométrique de l'iode sur **20** conduit à l'iodure **21** de manière quasi-quantitative. La réduction finale est conduite avec NaBH_4 dans le DME pour former l'hydruire **17**.

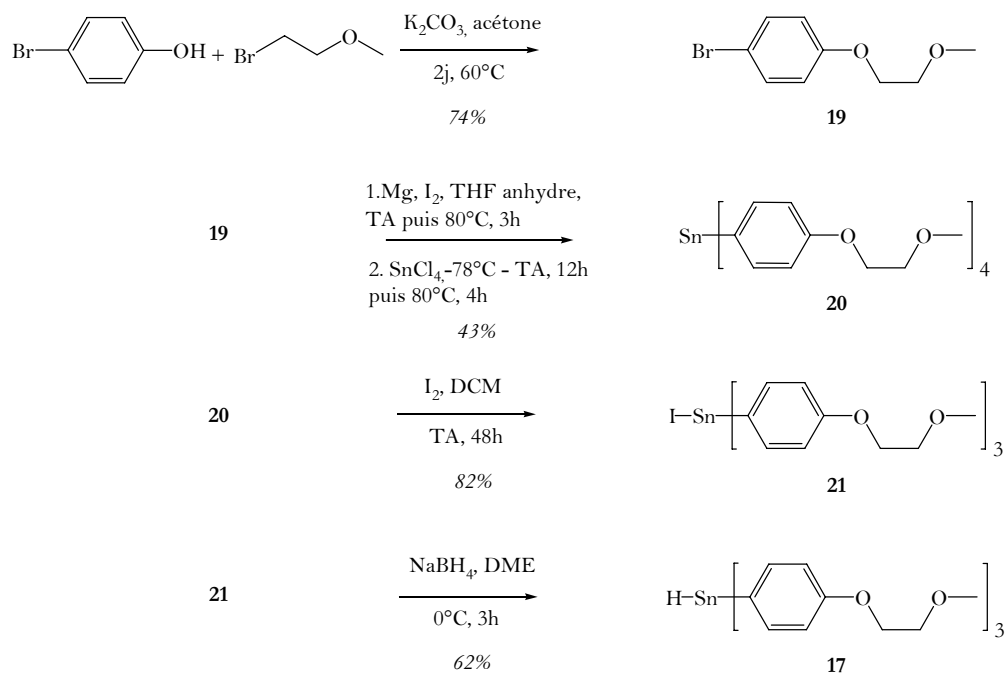


Schéma III-4 : synthèse du tris[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane

Malheureusement, le composé formé se révèle être insoluble dans l'eau.

II.2.2. Synthèse du tris[3-(2-méthoxyéthoxy)propyl]stannane

La synthèse de ce composé a été décrite par Breslow (Schéma III-5),⁴ puis confirmée par Breining.⁴⁰

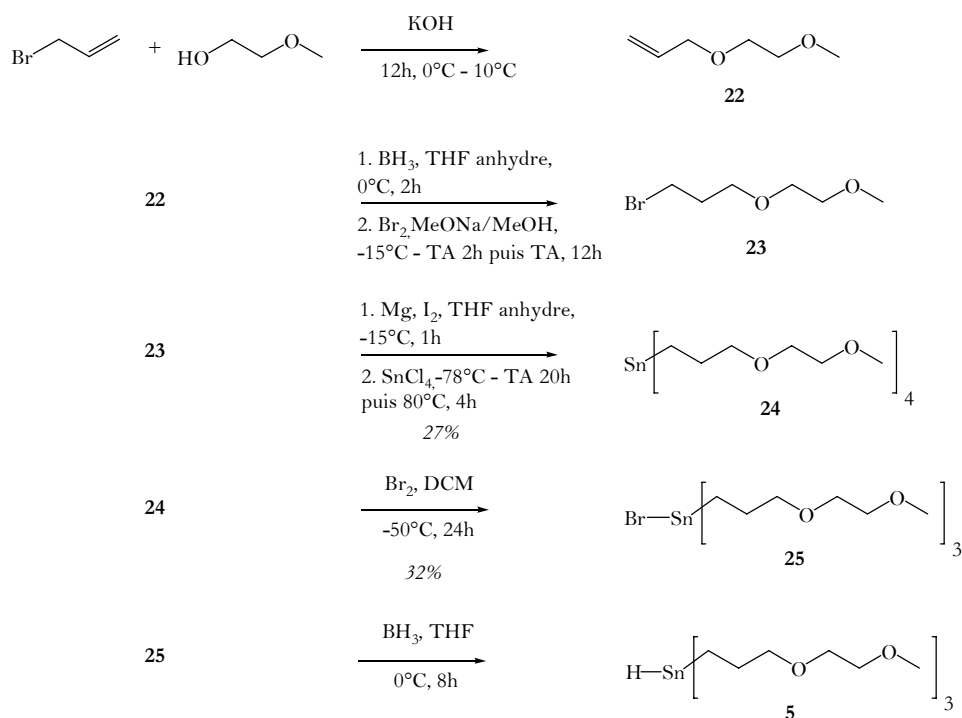


Schéma III-5 : synthèse du tris[4-(2-méthoxyéthoxy)propyl]stannane par la méthode de Breslow

La préparation réalisée diffère de celle originelle à plusieurs stades à cause de la non reproductibilité de nos expériences avec celles détaillées dans la littérature (Schéma III-6).

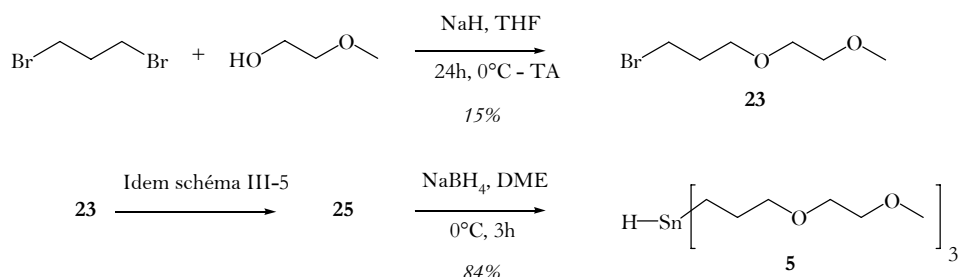


Schéma III-6 : modifications apportées à la synthèse du composé 5

A cause des faibles rendements des trois premières étapes, le composé final a été obtenu dans des quantités très modestes, de l'ordre de la dizaine de mg. Une fois mise au point, cette synthèse a été assurée par la technicienne du laboratoire, Florence Pillon.

Le composé **23** a été synthétisé selon plusieurs méthodes peu satisfaisantes, car le rendement est faible, voire nul pour la méthode d'hydroboration décrite par Breslow (étape 2). Finalement, c'est la substitution nucléophile entre le dibromopropane et le 2-méthoxyéthanol qui donne les résultats les plus acceptables. Le produit obtenu est très volatil.

Ensuite, on retrouve un schéma synthétique quasiment équivalent à celui décrit pour **17**. Le magnésien formé à la deuxième étape est beaucoup plus instable dû à son caractère aliphatique, le rendement pour **24** est donc moindre (beaucoup de produit secondaire dû au couplage de Wurtz). C'est ensuite le dérivé bromé de **24** qui est synthétisé, puis réduit juste avant utilisation *via* NaBH₄ pour donner l'hydrure **5**. L'huile translucide ainsi préparée est stockée à l'abri de la lumière sous argon à -20°C. Malgré ces précautions, ce produit se dégrade très rapidement (quelques jours).

II.3. Conclusions et perspectives

Trois hydrures ont finalement été obtenus, mais deux sont non solubles dans l'eau et le troisième est peu stable. L'hydrure de germanium, malgré sa non solubilité, a tout de même prouvé qu'il était capable d'effectuer des réductions de composés organiques en milieu strictement aqueux. Il est donc intéressant de connaître sa réactivité vis-à-vis des radicaux tyrosyle. Pour les hydrures d'étain, le composé **17** n'est pas hydrosoluble, donc on lui préférera son analogue aliphatique.

Une synthèse originale du composé **3** est en cours au laboratoire, afin d'une part de s'affranchir de la synthèse laborieuse du composé **5**, et d'autre part de vérifier sa stabilité. Il

pourrait offrir une alternative à **5** pour effectuer des expériences de marquage.

Avant de passer à la synthèse de réducteurs tritiés, nous avons voulu savoir si les composés choisis lors de l'étude bibliographique pouvaient réduire le radical tyrosyle. C'est pourquoi nous avons effectué les mêmes tests par spectroscopie RPE que ceux réalisés avec le sel de l'acide phénylphosphinique. En plus de ces analyses, nous avons observé la cinétique de la réaction catalytique de la BLC en présence des différents composés en mesurant les spectres UV-visible de la BLC et de ses intermédiaires réactionnels.

III. Etude de la réactivité du radical tyrosyle de la BLC vis-à-vis des différents réducteurs

III.1. Etude préliminaire

Pour chaque composé, on vérifie au préalable sa solubilité dans l'eau ainsi que son comportement vis-à-vis de l'acide peracétique par RMN ^1H .

Entrée	Composé	Solubilité	Stabilité dans D_2O	Effet du tampon Tris-maléate	Effet de l'ajout de PAA
1	13	20 mM	Stable	Sans effet	Sans effet
2	14	20 mM	Disparition signaux P-H	-	Sans effet
3	10	50 mM	Stable	Disparition signaux P-H	Sans effet
4	15	Insoluble	-	-	-
5	16	20 mM	Stable	Sans effet	Destruction
6	6	Insoluble	Stable	Sans effet	↘ signaux Ge-H (×2)
7	17	Insoluble	-	-	-
8	5	20 mM	Stable	↘ signal Sn-H (×3)	↘ signal Sn-H

Tableau III-2 : stabilité dans l'eau, vis-à-vis du tampon ou de l'acide peracétique des composés suivie par RMN. Spectres mesurés dans D_2O , avec 50 mM en Tris-maléate pH 7,6, ou 75 éq. en PAA (réaction env. 5 min à T.A.)

III.2. Analyse par RPE

III.2.1. Conditions opératoires

Seuls les composés solubles dans l'eau et non détruit par l'acide peracétique sont testés en RPE, i.e. les trois composés phosphorés **13**, **14** et **10** et l'hydruire d'étain **5**. De même que dans la chapitre II, on utilise la RPE pour suivre la formation et l'évolution du radical tyrosyle en présence des composés, i.e. d'étudier l'efficacité de la capture du radical tyrosyle par chacun des vecteurs.

On utilise les conditions expérimentales mises au point lors de l'étude initiale avec le sel de l'acide phénylphosphinique (47 éq. d'acide peracétique et 0,5 éq. de X-H pour 1 éq. d'hème).

III.2.2. Diminution de l'intensité du signal de la tyrosine visualisée par RPE

Les temps de mélange (BLC et PAA d'une part, ajout du vecteur et mélange d'autre part) sont identiques pour chacun des composés (10 s + 10 s). Afin de permettre la réaction de piégeage du radical en présence du composé réducteur, on congèle la réaction pour diminuer la cinétique de l'enzyme et on laisse ainsi incuber la solution avec le vecteur. On mesure les spectres à 4 K (hème et radical tyrosyle) et à 40 K (radical tyrosyle mieux résolu) après 30 s d'incubation dans la glace (t_1), puis 90 s supplémentaires (t_2), 2 min (t_3) et 2 min 30 (t_4).

Les chiffres dans le Tableau III-3 correspondent à la diminution de l'intensité du signal mesurée par RPE du radical tyrosyle après chaque temps de décongélation successif par rapport au temps de décongélation précédent (i.e. le ratio $\frac{I_{Y_{t(n+1)}}}{I_{Y_{t_n}}}$). On attribue la valeur 100 au signal maximal (à $t=0$ pour le témoin). Ensuite on regarde la décroissance de ce signal à t_1 , t_2 , etc.

Entrée	Composé	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
1	Témoin	100	100	42	12	5
2	13	100	100	14	5	3
3	14	100	67	39	14	-
4	10	80	53	8	2	-
5	5	100	91	35	-	-

Tableau III-3 : Diminution de l'intensité du signal de la tyrosine à 4 K selon le composé étudié

Les figures III-5 et III-6 reflètent la grande différence de réactivités des différents

vecteurs testés. Pour le phosphite de diméthyle **10**, le spectre à 40 K est également représenté (signal mieux résolu).

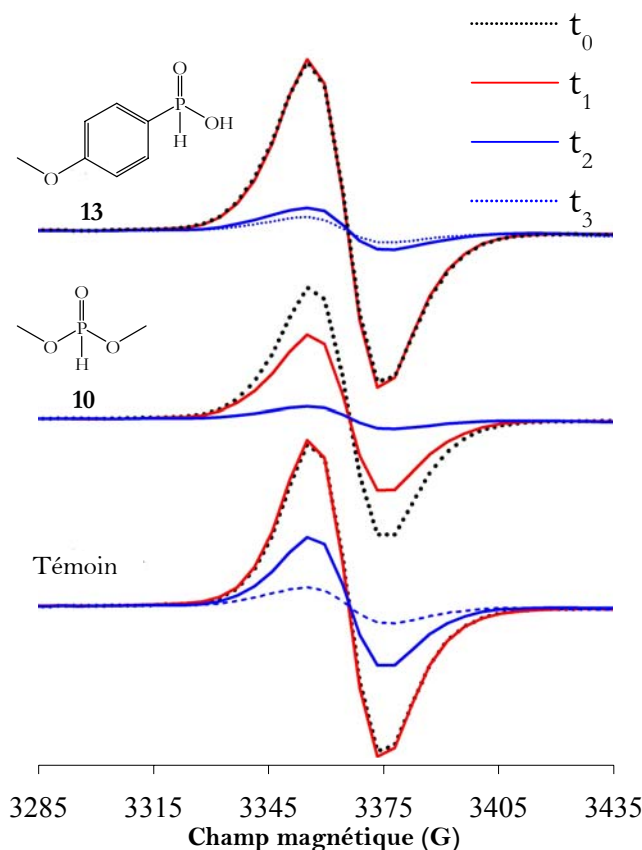


Figure III-5 : diminution du radical tyrosyle pour les composés **13** et **10** à 4 K (A). Comparaison pour t_0 du signal du radical tyrosyle de la BLC avec et sans composé **10** à 40 K (B).

On constate que :

- l'acide 4-méthoxy-phénylphosphinique **13** est plus efficace que le sel de l'acide phénylphosphinique. La seule addition de la fonction méthoxy sur le cycle benzénique augmente la cinétique de la réaction. Cela va dans le sens de la stabilisation du radical généré par transfert d'hydrogène à la tyrosine par effet mésomère donneur du méthoxy, d'où une liaison P-H plus faible que pour le sel de l'acide phénylphosphinique.

- pour le phosphite de diméthyle **10**, le signal à $t=0$ du radical tyrosyle est plus faible que pour le témoin (Figures III-5 et III-6, cette dernière représentant le signal à 40 K). Cela indique que la réaction entre le radical tyrosyle et le vecteur a lieu durant les vingt secondes de mélange, avant la congélation dans l'azote liquide qui arrête la réaction. Ceci est confirmé par la diminution du signal après 30 s et 90 s. Après, le signal est trop faible pour pouvoir être analysable. Cette molécule est de petite taille et non chargée ; cela peut expliquer qu'elle puisse accéder plus facilement au site actif de l'enzyme et réagir avec le radical.

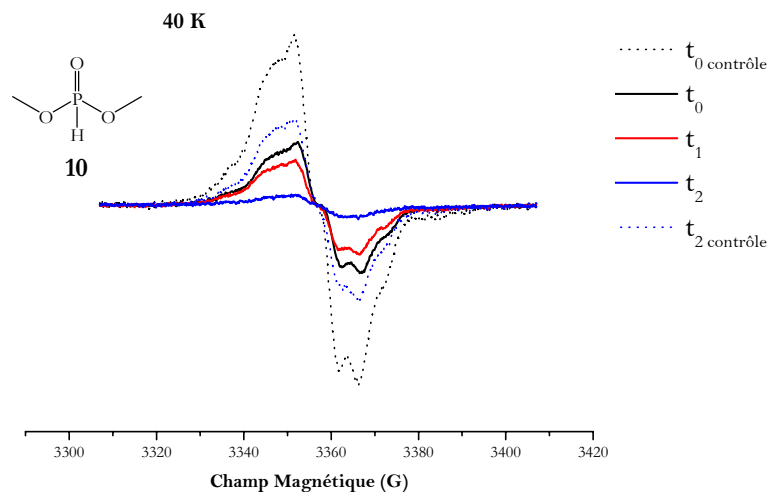


Figure III-6 : Comparaison pour t_0 du signal du radical tyrosyle de la BLC avec et sans composé 10 à 40 K (B).

La plus faible intensité du signal de **5** (Figure III-7) par rapport au témoin est due à une légère précipitation de l'enzyme, soit moins de radical formé. De ce fait, il est difficile de conclure sur sa réactivité.

L'oxyde de diphenylphosphine **14** manifeste une cinétique assez lente au départ, qui s'accroît ensuite. C'est une molécule relativement grande mais le radical associé est fortement stabilisé par résonance, résultant en une liaison P-H relativement faible.

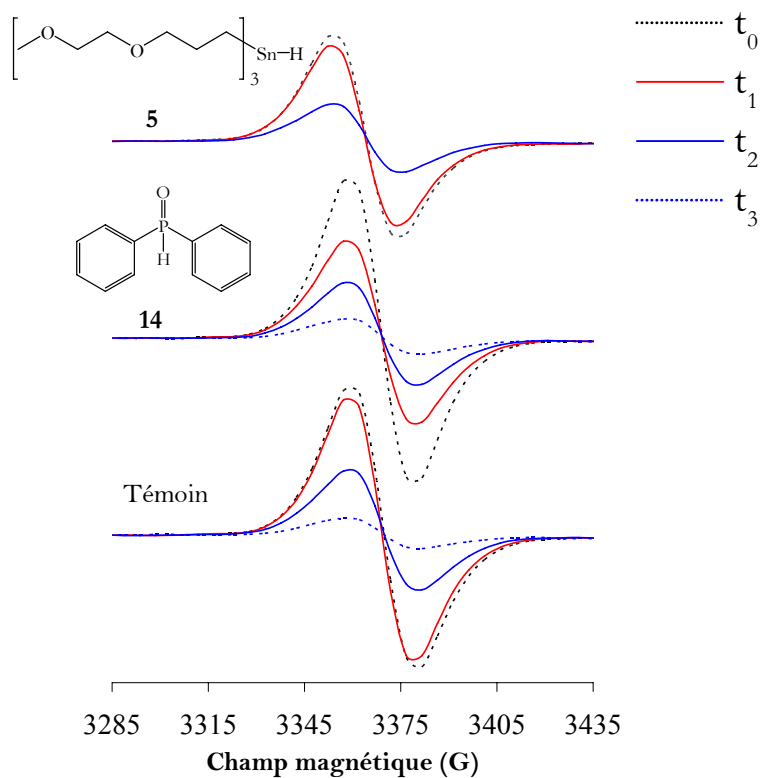


Figure III-7 : diminution du radical tyrosyle pour les composés 5 et 14

Cette étude montre donc que les trois composés phosphorés testés sont plus réactifs que le sel de l'acide phénylphosphinique vis-à-vis du radical tyrosyle, mais il est clair qu'ils réagissent différemment. Il semble que **13** et **14** présentent plus ou moins les mêmes caractéristiques vis-à-vis de la réaction avec le radical. En revanche, **10** montre une capacité à réagir avec le radical dès les premières secondes de réaction. Sa petite taille peut donc lui permettre de parvenir près du résidu tyrosyle et d'interagir directement avec lui, alors que les deux autres pourraient réagir *via* des transferts d'électron relayés par d'autres résidus, car dans leur cas la cinétique est plus lente. La capture du radical est inexistante à 77 K, et lorsque l'on laisse le mélange décongeler partiellement lors de l'incubation dans la glace, c'est alors que l'on voit un effet de la présence du vecteur.

Pour le dérivé stannylé, il est difficile de conclure quant à son efficacité. De plus, sa faible stabilité dans le temps représente un réel handicap pour conduire plusieurs séries d'expériences. C'est pourquoi un autre hydrure d'étain est en cours de préparation au laboratoire.

D'autre part, la cinétique d'augmentation du signal du fer pour chacun des composés reflète aussi la tendance que, plus le radical tyrosyle diminue, plus le signal du fer retourne vers celui de la protéine native. Par exemple, pour le composé **10** (phosphite de diméthyle, Figure III-8), on observe le retour à l'enzyme ferrique avec une cinétique beaucoup plus rapide que dans le témoin (Fe(IV)=O n'est pas visible par spectroscopie RPE).

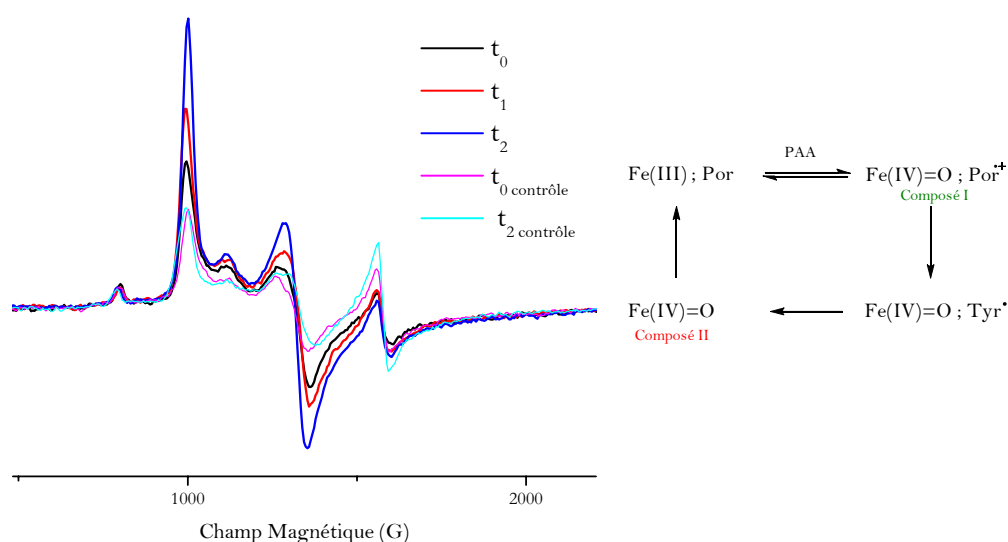


Figure III-8 : signal de l'enzyme ferrique avec et sans composé **10** (4 K)

On peut donc en conclure que parallèlement à la réaction avec la tyrosine, qui se caractérise par une diminution du signal à $g = 2$, on observe, à $g = 6$, une réduction du Fe(IV)=O en Fe(III) beaucoup plus rapide (t_0 , t_1 , t_2) que dans le cas du contrôle (t_{0c} , t_{2c}), où peu

de changement est remarqué. Il semble donc que la présence du réducteur phosphoré favorise la réduction du composé II en enzyme ferrique.

Nous avons donc montré qu'en parallèle de la diminution du radical tyrosyle, le composé réducteur permet le retour à l'enzyme native. Il pourrait donc à la fois piéger le radical et permettre au cycle enzymatique de "tourner" plus rapidement.

III.3. Analyse par spectrophotométrie UV-visible

III.3.1. Mise au point des conditions expérimentales

Les conditions utilisées sont légèrement différentes de celles des expériences de RPE (190 éq. de PAA/hème et 2 éq. de vecteur/hème). L'enzyme est diluée d'un facteur 100. La température de mélange est bien plus propice à la formation de $[\text{Fe(IV)=O Por}^{*+}]$ que du radical tyrosyle. C'est pourquoi la quantité d'acide peracétique est plus importante afin de mieux observer la bande caractéristique de Fe(IV)=O du composé II, dont la formation est, dans ces conditions, défavorisée.

La réaction des trois composés phosphorés, de l'hydruire d'étain **17** et du cyclohexadiène **15** avec la BLC a été suivie par les variations du spectre d'absorption.

III.3.2. Résultats

Les composés **13** et **14** sont les seuls affichant une modification dans le spectre d'absorption de la BLC. Pour **10**, on n'observe pas d'effet lors de son ajout par rapport au témoin. Cela pourrait provenir d'une réaction trop rapide entre le radical et le composé, masquée par le fait que l'acide peracétique est ajouté en grand excès. Pour les deux autres composés (**15** et **17**), on peut émettre l'hypothèse que leur manque de solubilité dans l'eau empêche de visualiser par spectrophotométrie leur réaction avec le radical tyrosyle.

III.3.2.a. Acide 4-méthoxy-phénylphosphinique **13**

Sur la Figure III-9 est représenté en noir le spectre UV de la protéine native, avec la bande de Soret à 405 nm et les bandes de transfert de charge α et β à 619 et 634 nm respectivement.⁴¹

Lorsque l'on ajoute l'acide peracétique, la formation du composé I induit un déplacement bathochrome des bandes de transfert de charge vers 660 nm (caractéristique de l'oxoferryle-porphyrine), correspondant aux données observées dans la littérature.⁴²⁻⁴⁴ De plus,

on observe une diminution drastique de l'intensité de la bande de Soret (hypochromicité de 40%), ainsi que son élargissement.

Lorsque le temps de réaction augmente, on observe l'apparition du composé II, de manière concomitante avec la diminution de la bande à 660 nm. Les caractéristiques de cet intermédiaire sont le déplacement hypsochrome des bandes de transfert de charge à 565 et 530 nm, en plus du déplacement bathochrome de la bande de Soret (430 nm).

En présence de vecteur, la cinétique de la réaction est fortement ralentie (Figure III-9, courbes bleue à verte, trait plein).

Le signal du composé I diminue plus lentement : le niveau d'absorption à 10 minutes est équivalent à celui pour le contrôle à 4 min. En conjonction de cela, on constate la formation du composé II (trace épaisse), alors que l'enzyme sans vecteur retourne vers la forme native de l'enzyme. On note également à 4 et 10 minutes un déplacement vers le rouge de la bande de Soret correspondant à l'oxoferryll [Fe(IV)=O].

Il y a donc stabilisation du composé I (diminution de la cinétique de réaction) et accumulation du composé II en présence de vecteur (possible réaction entre le vecteur et le radical tyrosyle pour former le composé II, inactif). On montre également que **13** ne réagit pas avec l'intermédiaire [Fe(IV)=O Por^{•+}], permettant ainsi la formation du radical tyrosyle.

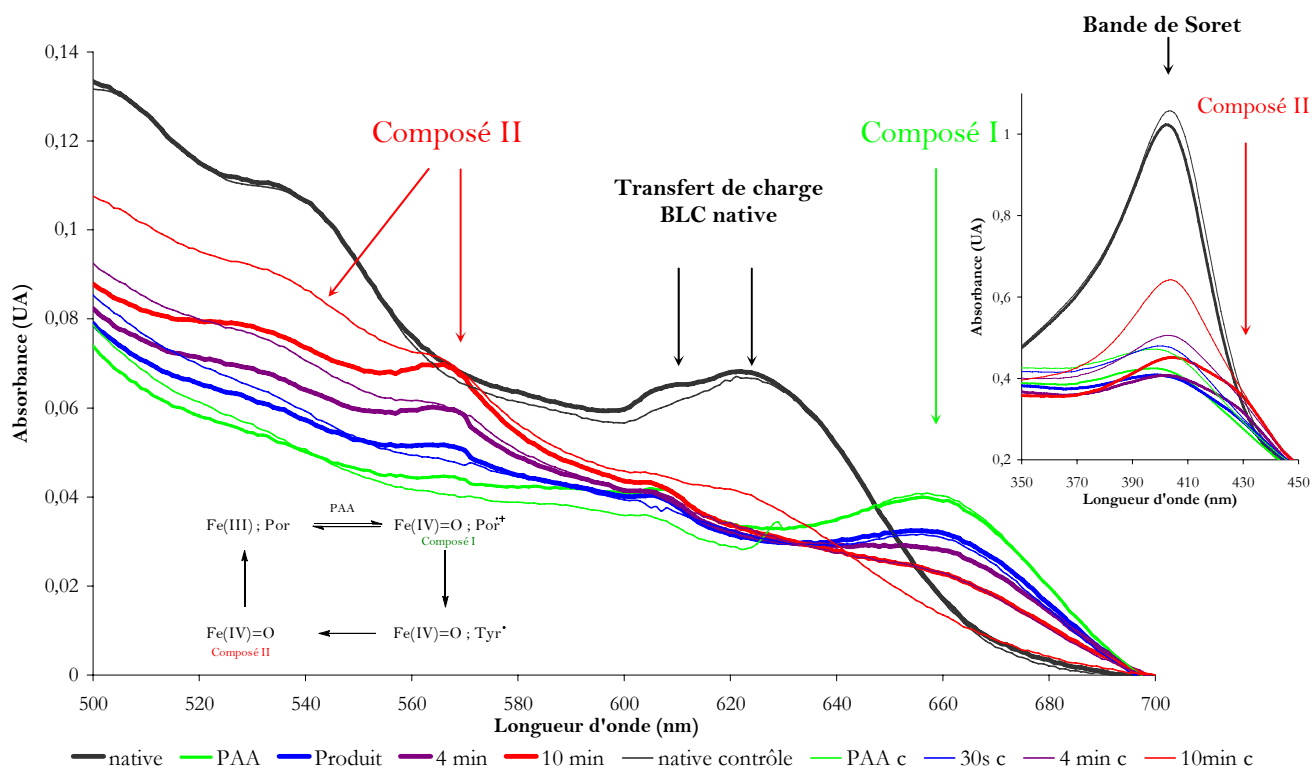


Figure III-9 : Spectre d'absorption du système BLC/PAA/composé 13 dans la zone de Soret (droite) et entre 500 et 700 nm (gauche). Trace fine : contrôle, trace épaisse, expérience avec vecteur

III.3.2.b. Oxyde de diphénylphosphine 14

Comme dans le cas de l'acide *p*-méthoxy-phénylphosphinique, on observe un ralentissement de la cinétique de la réaction par rapport au contrôle (Figure III-10).

On note aussi, à 10 minutes, le léger déplacement vers le rouge de la bande de Soret correspondant au composé II, mais beaucoup moins marqué que dans le cas du composé 13. Ici c'est surtout le composé I qui est stabilisé. On constate effectivement une augmentation de la bande à 660 nm par rapport au contrôle, alors que la bande correspondant à l'oxoferryle a tendance à diminuer.

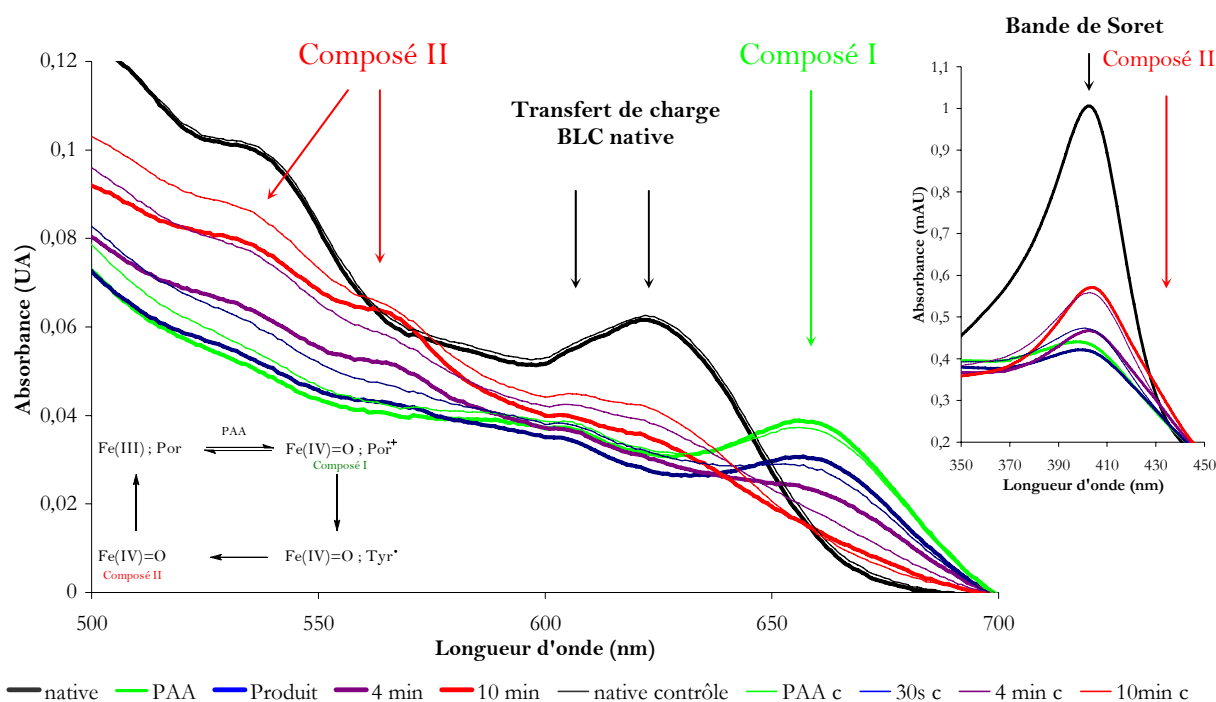


Figure III-10 : Spectre d'absorption du système BLC/PAA/composé 14 dans la zone de Soret (droite) et entre 500 et 700 nm (gauche). Trace fine : contrôle, trace épaisse, expérience avec vecteur

Ces expériences permettent d'observer l'effet qualitatif du vecteur, mais pour avoir un meilleur aperçu de la réaction, il faudrait les compléter avec des expériences de "stopped-flow" ou à basse température.

Malgré tout, on observe tout de même un effet sur le spectre visible lors de l'ajout des réducteurs. Ces expériences viennent compléter les résultats obtenus par RPE, qui eux montrent la diminution du radical tyrosyle, par observation de la formation et du devenir du composé II. Il semble que celui s'accumule plus en présence des composés, ce qui peut d'une certaine manière mettre en évidence la capture du radical tyrosyle, menant à la formation du composé II. Il est normal que, dans ces expériences, on observe un retour plus rapide à l'enzyme ferrique, puisqu'à température ambiante la réaction très majoritaire est la réaction d'activité catalase (dismutation de l'acide peracétique par passage *via* le composé I). La

formation du radical tyrosyle (activité peroxydase) est dans ce cas défavorisée (d'où l'utilisation d'un grand excès d'acide peracétique pour forcer la réaction), même si l'on montre que l'utilisation des vecteurs induit une activité peroxydase de l'enzyme plus importante.

III.4. Perspectives

En marge de ces mesures par spectroscopie RPE et spectrophotométrie UV-visible, nous avons entrepris des expériences de spectrométrie de masse sur la BLC en mélange avec les composés **10**, **13** et **14** (collaboration avec P. Loewen, Département of Microbiology, The University of Manitoba, Canada) afin de mieux comprendre la réactivité des composés utilisés. Ces mesures sont actuellement en cours de réalisation. Si ceux-ci réagissent par formation d'adduits sur la protéine, la différence dans le spectre de masse entre témoin et protéine (ou ses peptides tryptiques) sera détectable. On pourra peut être déterminer comment la capture du radical s'effectue et même localiser la formation du radical.

III.5. Conclusion

En conclusion de ces expériences sur la BLC, il apparaît que les essais réalisés sur l'enzyme avec les différents composés ne sont pas suffisants pour choisir un nouveau vecteur de tritium. Même si certaines substances (**10** en particulier) semblent présenter de meilleures caractéristiques (notamment cinétiques) nécessaires pour la réaction de marquage de la BLC que le sel de l'acide phénylphosphinique, il reste que les informations concernant leur capacité à transférer un atome de tritium de manière irréversible et quantifiable doit encore être démontrée. En effet, la capture du radical tyrosyle par le sel de l'acide phénylphosphinique semblait effective par analyse du spectre RPE, mais les essais de marquage n'ont pas abouti. C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur un système plus simple pour cribler chacun des vecteurs.

Pour modéliser le système, nous avons choisi d'analyser la réaction de chacune des structures avec le radical tyrosyle en solution. En effet, même si le radical généré est moins stable (durée de vie beaucoup plus courte entraînant des phénomènes de recombinaison) et possède un environnement différent de celui de la protéine, il est beaucoup plus facile d'étudier les phénomènes de réparation dans ces conditions. En particulier, nous voulons déterminer l'incorporation isotopique dans la tyrosine induite par la présence du vecteur.

Pour ce faire, nous avons choisi de créer les radicaux tyrosyle par réaction avec les radicaux hydroxyle issus de la radiolyse de l'eau. L'ensemble de ce travail a été réalisé en

étroite collaboration avec Serge Pin et Jean-Philippe Renault du Laboratoire de Radiolyse (CEA/Saclay/DSM/DRECAM).

IV. Etude de la réactivité du radical tyrosyle en solution vis-à-vis des différents réducteurs

IV.1. Systèmes étudiés

On applique la méthodologie développée par Anderson *et coll.* (références 18,19,45 et Chapitre I) en l'élargissant à une série de molécules, afin d'évaluer leur capacité à transférer un atome de ^2H sur la tyrosine. La réaction de la tyrosine en solution avec les radicaux hydroxyle forme des radicaux tyrosyle. En présence d'un vecteur deutéré, un ou des atomes de deutérium sont transférés sur le radical tyrosyle et peuvent former de la tyrosine deutérée (méthode d'Anderson décrite au chapitre I, partie II.8.2).

On regarde le taux d'incorporation en deutérium par spectrométrie de masse dans la tyrosine lors de l'attaque de radicaux hydroxyle en présence de l'agent réparateur. La régiosélectivité de la formation des radicaux sera étudiée par RMN ^2H .

Cependant, comme toutes les molécules, soit commerciales, soit synthétisées, n'étaient pas deutérées, nous avons choisi de transposer le système à la tyrosine perdeutérée (Tyr- d_7), et de regarder l'incorporation d'hydrogène dans la tyrosine (Schéma III-7).

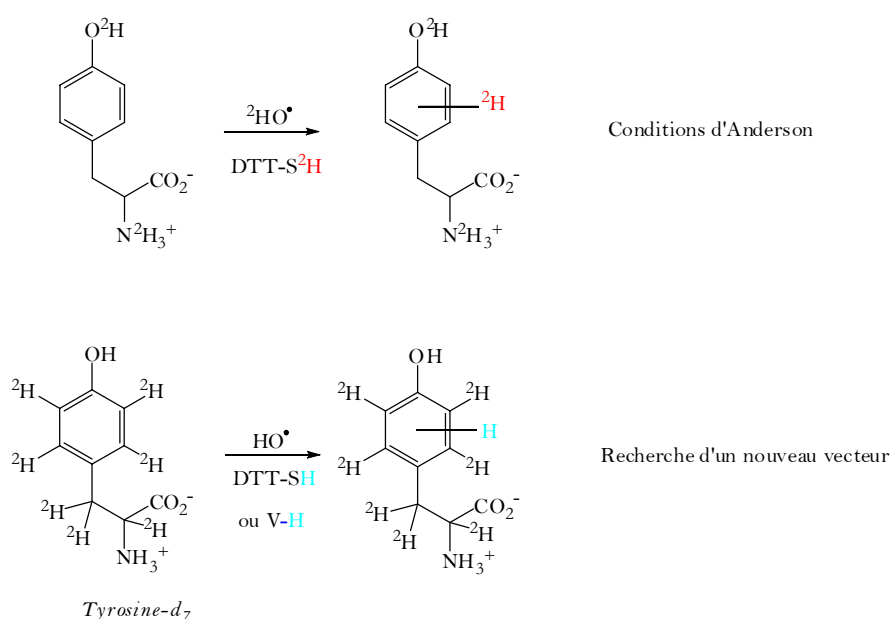


Schéma III-7 : méthodologie employée pour la recherche d'un nouveau vecteur

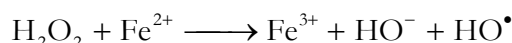
La mise au point des expériences a été faite en premier lieu avec le dithiothreitol comme agent deutéré, sur la tyrosine dans D₂O, puis sur la tyrosine-*d* dans H₂O.

IV.2. Méthode de formation des radicaux hydroxyle

Il existe plusieurs méthodes pour former les radicaux hydroxyle, espèces extrêmement réactives (cinétique de réaction de l'ordre de 10¹⁰ M⁻¹.s⁻¹) :

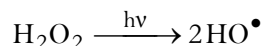
- La réaction de Fenton
- La photolyse du peroxyde d'hydrogène
- La radiolyse de l'eau

H₂O₂ peut réagir avec des ions métalliques (Fe²⁺, Cu⁺) par réaction de Fenton (Equation III-1) pour former les radicaux hydroxyle. En présence d'un réducteur comme l'ascorbate, le Fe²⁺ est régénéré, permettant ainsi de continuer le cycle.⁴⁶



Equation III-1 : réaction de Fenton

Ces espèces sont aussi formées à la suite d'une irradiation lumineuse (UV), par photolyse de l'eau ($\lambda < 185$ nm) ou du peroxyde d'hydrogène ($\lambda \sim 250$ nm), Equation III-2.^{47,48}



Equation III-2 : création de radicaux hydroxyle par photolyse

Dans notre méthode, nous avons choisi de créer les radicaux hydroxyle par radiolyse de l'eau. Cette dernière voie ne nécessite pas l'ajout de substances chimiques supplémentaires.

IV.3. Espèces primaires créées lors de la radiolyse de l'eau

Le phénomène de radiolyse utilise des rayonnements ionisants, qui sont des photons de haute énergie (rayons X, γ), des particules comme les électrons (rayonnement β), des noyaux d'hélium (particule α) ou des neutrons.⁴⁹⁻⁵¹ Les radicaux primaires produits sont donnés par l'Equation III-3.



Equation III-3 : espèces créées lors de la radiolyse de l'eau

On donne généralement le rendement radiolytique de ces espèces sous forme de

valeurs de G, correspondant au nombre de molécules formées pour 100 eV absorbés (Tableau III-4).

Entrée	Espèce	Rendement chimique radiolytique ($\mu\text{mol.J}^{-1}$)
1	H_3O^+	0,28
2	HO^\bullet	0,28
3	H^\bullet	0,06
4	e_{aq}^-	0,28
5	H_2O_2	0,07
6	H_2	0,06

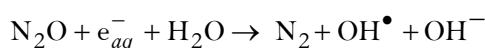
Tableau III-4 : Rendement chimique radicalaire (pH 7) des espèces créées par radiolyse de l'eau⁵²

L'électron aqueux et l'atome d'hydrogène sont de puissants réducteurs ($E(V)=-2,87$ et $E(V)=-2,40$ respectivement)⁵³ et le radical hydroxyle un oxydant fort ($E(V)=1,90$).⁵³ Les espèces réductrices réagissent rapidement avec l'oxygène dissous pour former HO_2^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$.⁵⁴

En l'absence d'oxygène, l'électron aqueux réagit par addition sur un ion ou une molécule à système conjugué ou aromatique ; il peut aussi déshalogéner des substrats. L'atome d'hydrogène, comme le radical hydroxyle, arrache un atome d'hydrogène pour former H_2 (ou H_2O) ou s'additionne sur une double liaison. $^\bullet\text{OH}$ peut aussi arracher un électron d'une molécule pour former un radical cation.⁵⁵ Ce radical, malgré son haut potentiel redox, préfère réagir par addition plutôt que de transférer un électron.

En jouant sur les conditions expérimentales, en particulier sur le pH ou sur la nature du gaz utilisé pour désaérer les solutions, certaines espèces peuvent être capturées pour former des espèces secondaires. Ainsi les bas pH favoriseront la formation de l'atome d'hydrogène au détriment de l'électron aqueux. La base conjuguée du radical hydroxyle $\text{O}^{\bullet-}$ ($\text{pK}_a=11,9$) réagit plutôt par oxydation que par addition.⁵²

Le dégazage à l'azote et à l'argon produit une solution désoxygénée. L'utilisation du protoxyde d'azote permet de convertir l'électron aqueux formé lors de la radiolyse de l'eau en radical hydroxyle, selon l'équation :



Equation III-4 : intérêt de l'utilisation de N_2O

IV.4. Source d'irradiation choisie

La dose est exprimée en Gray (Gy, unité SI, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$). L'irradiation est conduite

en utilisant une source de ^{137}Cs , délivrant un rayonnement γ .

Pour une concentration en substrat inférieure à 100 mM, le phénomène d'ionisation directe est négligeable, le substrat n'est soumis qu'à l'action des espèces réactives issues de la radiolyse de l'eau. La radiolyse par source γ est un état où les concentrations sont quasi stationnaires, de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-12} M pour HO^\bullet . Plus la durée d'irradiation augmente, plus la quantité produite d'espèces réactives augmente. Dans ce cas, on ne peut analyser que les produits obtenus. Cette technique ne peut être utilisée pour l'étude quantitative des intermédiaires réactionnels pendant l'irradiation.

IV.5. Mise au point de la méthode d'analyse de l'incorporation par LC-MS

IV.5.1. Détermination de l'abondance isotopique naturelle par MS

IV.5.1.a. Dansylation de la tyrosine

La méthode de détermination de l'incorporation isotopique a été mise au point sur la tyrosine dansylée (DNS-Y, Figure III-11).

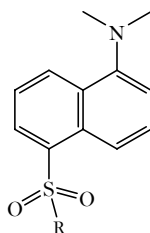


Figure III-11 : Groupement dansyl

L'intérêt de la dansylation est triple puisqu'elle permet, outre la détection UV de nanomoles de l'acide aminé lors la purification par HPLC, de mieux solubiliser la tyrosine (en particulier dans le méthanol) et de décaler la masse moléculaire de celle-ci de 181 à 414. Cette astuce permet ainsi d'éviter, lors de l'analyse par spectrométrie de masse, de contaminer les signaux de la tyrosine avec ceux des bas poids moléculaires comme le tampon. De plus, la DNS-Y répond mieux en spectrométrie de masse que la tyrosine seule.

La tyrosine est suspendue dans du tampon NaHCO_3 0,5 M pH 8,3, puis du chlorure de dansyle (DNS-Cl) dans l'acétone est ajouté (Schéma III-8). DNS-Cl réagit avec les bases libres, avec une réactivité plus grande pour $-\text{NH}_2$ que $-\text{OH}$, c'est pourquoi la réaction est effectuée en milieu légèrement alcalin.⁵⁶

A ce pH en utilisant DNS-Cl en large excès, on ne favorise la monodansylation que sur l'amine, ce qui permet d'obtenir un seul produit et non les produits de monodansylation sur

l'alcool et bidansylation de l'alcool et de l'amine. Le composé dansylé est alors purifié par HPLC.

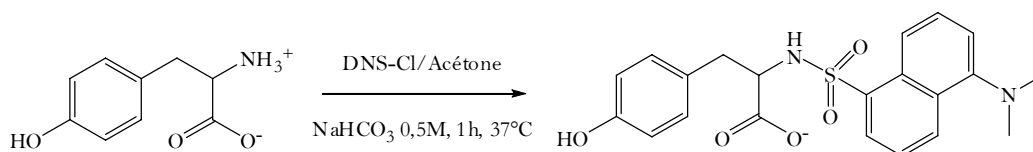


Schéma III-8 : Dansylation de la tyrosine

IV.5.1.b. Mesure de l'abondance isotopique naturelle

Pour la tyrosine dansylée, l'abondance relative isotopique naturelle est calculée en tenant compte de l'abondance naturelle de chacun des isotopes présents dans la molécule (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{33}S , etc.). La formule brute de la DNS-Y est $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$, soit une masse exacte de 414,1 g.mol $^{-1}$.

Les abondances relatives isotopiques naturelles sont données dans le Tableau III-5:

m/e	414,1	415,1	416,1	417,1
Abondance relative	100%	25,4%	8,5%	1,6%

Tableau III-5 : abondance relative isotopique naturelle de la tyrosine dansylée

La tyrosine dansylée est injectée plusieurs fois de suite en LC-MS. La valeur obtenue est moyennée sur le nombre d'injections et l'écart-type est calculé.

Selon le Tableau III-6, on voit que les valeurs mesurées sont très reproductibles d'une série d'expériences à une autre. Néanmoins, pour chaque série d'expériences, une injection systématique de témoin pour chaque échantillon sera effectuée, afin de parer à une éventuelle dérive des mesures.

On regarde la monodeutération de la tyrosine dansylée, i.e. l'augmentation du signal de la masse à 415.

Entrée	Nombre d'injections	Abondance naturelle moyenne (%)
1	3	24,6% \pm 0,2%
2	4	24,4% \pm 0,1%
3	9	24,4% \pm 0,1%
4	3	24,3% \pm 0,3%

Tableau III-6 : mesure de l'abondance isotopique naturelle par LC-MS

L'écart au théorique est en moyenne de 1%.

IV.5.2. Validation de la méthodologie de mesure de l'incorporation

IV.5.2.a. Calcul de l'incorporation

L'allure du spectre de masse obtenu pour une faible incorporation est représentée sur la Figure III-12.

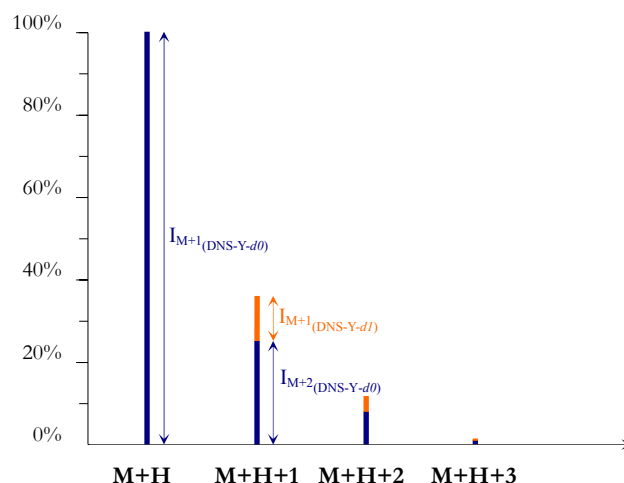


Figure III-12 : spectre de masse de la tyrosine dansylée marquée au deutérium

Pour une monodeutération (uniquement étudiée ensuite), on définit l'incorporation isotopique en deutérium $Inc(\%)$ par : $Inc(\%) = \frac{I_{M+1(DNS-Y-d1)}}{I_{M+1(DNS-Y-d0)} + I_{M+1(DNS-Y-d1)}}$, avec les grandeurs $I_{M+1(DNS-Y-d0)}$ et $I_{M+1(DNS-Y-d1)}$ définies Figure III-12).

En normalisant, on obtient : $Inc(\%) = \frac{(R_i - R_t) \times 100}{100 + (R_i - R_t) \times 100}$ (Equation III-5), avec :

$$R_i = \frac{[M+H+1]^+}{[M+H]^+}(DNS-Y)_{irradiée} \text{ et } R_t = \frac{[M+H+1]^+}{[M+H]^+}(DNS-Y)_{témoin}$$

Cette relation est valable quel que soit le taux d'incorporation dans la tyrosine.

IV.5.2.b. Synthèse de la tyrosine-*d*

On synthétise facilement la tyrosine *ortho*-deutérée à partir de 3-iodotyrosine selon une procédure décrite avec du tritium gaz (Schéma III-9).⁵⁷

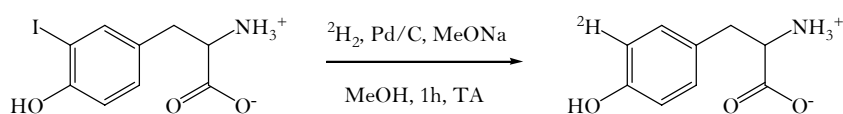


Schéma III-9 : synthèse de la *o*-tyrosine-*d* à partir de *o*-iodotyrosine

La réaction est quantitative et la purification de la tyrosine s'effectue par

recristallisation dans l'eau à pH 5,5.

L'incorporation isotopique de la tyrosine- d_1 est mesurée par SM *via* le dérivé dansylé (Equation III-5) et par RMN ^1H par détermination des intégrations relatives à chaque signal

$$\text{par : } Inc(\%)_{\text{RMN } ^1\text{H}} = \frac{I_{ortho}}{I_{\alpha}} \quad (\text{Equation III-6})$$

Les résultats donnés par les deux méthodes concordent (Tableau III-7).

Incorporation isotopique	
RMN ^1H	SM
98%	97%

Tableau III-7 : analogie entre les résultats d'incorporation isotopique calculés *via* les deux techniques

IV.5.2.c. Détermination de l'erreur sur les mesures

Des mélanges connus de solutions de tyrosine- d_0 et $-d_1$ sont préparés afin de déterminer si l'incorporation calculée par spectrométrie de masse (dansylation du mélange puis analyse) et par RMN ^1H reflète le mélange isotopique réellement analysé. Les résultats sont présentés dans le Tableau III-8.

Entrée	% Y- d_1 calculé	% Y- d_1 mesuré par RMN ^1H	% Y- d_1 mesuré par LC-MS
1	20	23,0%	20,6% \pm 0,4%
2	10	12,0%	9,1% \pm 0,1%
3	5	8,0%	6,6% \pm 0,1%
4	1	4,0%	1,1% \pm 0,2%

Tableau III-8 : mesure de l'erreur sur la détermination de l'incorporation isotopique par RMN ^1H et SM (moyenne de 3 injections)

Cela signifie que la spectrométrie de masse est un outil efficace et puissant pour étudier l'incorporation isotopique de la tyrosine puisque l'écart est faible entre la mesure déterminée par mélange et la mesure analysée. La RMN, quant à elle, ne donne pas de résultats satisfaisants.

IV.6. Etude de la réactivité des différents vecteurs vis-à-vis de Tyr $^{\bullet}$

IV.6.1. Mise au point sur le système Tyr/DTT/D $_2$ O

La première série consiste à reproduire exactement la manipulation décrite par l'équipe

d'Anderson sur la tyrosine mais aussi la leucine, puisque d'après les travaux de Guillaume Mousseau réalisés au laboratoire, c'est l'acide aminé qui se marque le mieux.⁵⁸ Le protocole suivi pour préparer les échantillons et la mise au point des différents systèmes chromatographiques utilisés sont détaillés dans le chapitre V, partie VIII.

Les résultats obtenus (Tableau III-9) diffèrent de manière surprenante de ceux décrits dans la littérature (travaux d'Anderson, cf. chapitre I).^{18,19,45} $[^2\text{HO}^\bullet]$ représente la concentration totale produite en radical hydroxyle et Inc. (%) l'incorporation isotopique calculée pour la tyrosine.

Entrée	Source	AA	$[^2\text{HO}^\bullet]$	Inc. (%)
1	littérature	Y	50 μM	9,8%
2	résultats	Y	50 μM	0,7%
3	littérature	L	50 μM	10,2%
4	résultats	L	50 μM	0,6%

Tableau III-9 : Irradiation de Y et L en présence de DTT; $[\text{Y}]=[\text{L}]=100 \mu\text{M}$, $[\text{DTT}]=33 \mu\text{M}$, $[\text{Pi}]=10 \text{ mM}$, $\text{pD}=7,2$, bullage N_2O

On constate qu'il n'y a quasiment pas de marquage sur la tyrosine quand on tente de reproduire les expériences décrites par Anderson. Le même essai a été effectué avec la leucine comme substrat, pour déterminer si c'est la nature même de la tyrosine qui donne des résultats peu en accord avec ceux de la littérature. Là encore, on n'observe qu'un marquage très léger. En ce qui concerne la tyrosine, la chimie d'addition des radicaux hydroxyle en plus du phénomène d'arrachement des hydrogènes de la chaîne latérale peut expliquer le faible marquage. Les résultats obtenus par l'équipe d'Anderson sur cet acide aminé se sont révélés peu reproductibles,⁵⁹ ce qui n'est pas le cas avec la leucine. On a donc choisi d'augmenter la concentration en HO^\bullet (Tableau III-10).

Entrée	$[^2\text{HO}^\bullet]$	Inc. (%)
1	50 μM	0,7 %
2	190 μM	2,6 % \pm 0,2%
3	760 μM	23,7 %

Tableau III-10 : Irradiation de Y en présence de DTT; $[\text{Y}]=100 \mu\text{M}$, $[\text{DTT}]=33 \mu\text{M}$, $[\text{Pi}]=10 \text{ mM}$, $\text{pD}=7,2$, bullage N_2O

Le but de cette série est d'augmenter le marquage sur la tyrosine, même si, dans ces conditions, elle est fortement dégradée, et ce pour pouvoir transposer plus facilement la méthode à la tyrosine-*d* (qui sera utilisée ultérieurement pour cribler tous les composés

choisis). En effet, dans ce cas, l'effet isotopique est défavorable à la perte d'un atome de deutérium (la liaison C-H se rompt plus facilement que la liaison C-²H). On observera donc un enrichissement plus faible en hydrogène dans la tyrosine-*d* que celui observé en deutérium sur la tyrosine, i.e. le système inverse étudié précédemment.

Les valeurs obtenues pour réaliser un criblage des différents composés capables de transférer un atome d'hydrogène à la tyrosine à 50 et 190 µM en HO• sont trop faibles pour être transposées à la tyrosine-*d*. A 760 µM, le marquage est très élevé mais la quantité de tyrosine récupérée est très faible (de l'ordre de 5%).

On fait donc varier la quantité de DTT pour déterminer les conditions optimales pour le marquage de la tyrosine (Tableau III-11). %Y représente le pourcentage de tyrosine récupérée après l'irradiation (calculée selon un standard par HPLC).

Entrée	[DTT]	[² HO•]	Nombre d'éq. DTT	%Y	Inc. (%)
1	33 µM	190 µM	1/3	21%	2,6 % ± 0,2% (4)
2	100 µM	190 µM	1	63%	0,6 % ± 0,2%(2)
3	200 µM	190 µM	2	74%	1,3% ± 0,4% (2)
4	33 µM	760 µM	1/3	~ 5%	17,5% ± 0,3% (2)
5	50 µM	760 µM	1/2	20%	7,5%
6	100 µM	760 µM	1	42%	4,9%± 0,4% (2)
7	200 µM	760 µM	2	57%	2,4% ± 0,1% (3)

Tableau III-11 : Irradiation de Y en présence de DTT; [Y]=100 µM, [Pi]=10 mM, pD=7,2, bullage N₂O

On observe bien qu'il faut produire une quantité assez importante en radicaux hydroxyle pour introduire suffisamment de deutérium. Dans les expériences suivantes, on se placera dans les conditions des entrées 1, 4 et 6 pour d'une part maximiser l'incorporation (entrée 4) et d'autre part recueillir suffisamment de matériel pour que la mesure soit significative (entrées 1 et 6), en obtenant en même temps une quantité de marquage suffisante pour observer des variabilités dans la réactivité.

IV.6.2. Transposition de la méthode à Tyr-*d*

IV.6.2.a. Incorporation par le DTT

Une fois les conditions opératoires mises au point avec le système Tyr/DTT dans D₂O, on étudie le système inverse Tyr-*d*/DTT dans H₂O, en mesurant l'incorporation en

hydrogène. On mesure au préalable la pureté isotopique basale de la tyrosine-*d*, i.e la quantité de tyrosine *d* présente. Celle-ci est égale à 5,4%.

Le Tableau III-12 résume les résultats obtenus. En comparant les deux dernières colonnes, i.e. les incorporations obtenues sur la tyrosine et sur la tyrosine-*d*, il apparaît clairement que la transposition du système engendre une baisse de l'incorporation observée.

Un phénomène pouvant expliquer cette diminution est l'effet cinétique primaire, impliquant que la perte d'un atome d'hydrogène est plus favorable que celle d'un deutérium pour réinstaurer l'aromaticité du cycle benzénique.

Entrée	[DTT]	[HO [•]]	Inc. (%) (H ₂ O)	Inc. (%) (D ₂ O)
1	33 μM	190 μM	1,2%	2,6 % ± 0,2% (4)
2	33 μM	760 μM	10,4%	17,5% ± 0,3% (2)
3	100 μM	760 μM	1,3%	4,9% ± 0,4% (2)
4	200 μM	760 μM	0,5%	2,4% ± 0,1% (3)

Tableau III-12 : irradiation de la tyrosine en présence de DTT ; [Y-*d*]=100 μM, [Pi]=10 mM, pH=7,2, bullage N₂O

IV.6.2.b. Test des différents vecteurs

Tous les composés choisis, exceptés les hydrures d'étain, ont été testés, afin de vérifier leur capacité à transférer un atome d'hydrogène sur la tyrosine-*d*. Les résultats sont regroupés dans le Tableau III-13.

Deux concentrations en vecteurs ont été expérimentées. A 33 μM en agent réparateur, l'incorporation sera forte mais se fera au détriment de la quantité de tyrosine récupérée. A 100 μM, en revanche, on observe la situation inverse : une quantité plus grande de tyrosine, affichant une faible incorporation.

Le premier constat qui découle de ces résultats est qu'ils sont ardues à analyser car la fraction de radicaux hydroxyle réagissant avec la tyrosine est difficile à estimer. En effet, l'agent réparateur réagit lui aussi avec les radicaux hydroxyle. Cette réaction parasite incontournable diminue à la fois la capacité du vecteur à réparer (destruction de la liaison X-H) et le nombre de radicaux créés sur la tyrosine. Les conditions sont telles que l'on ne peut estimer une valeur des constantes de vitesse de chacun des composés et la comparer avec celle de la réaction entre HO[•] et tyrosine, donc en déduire la portée des réactions secondaires. Le phénomène de réaction entre vecteur et HO[•] est d'autant plus important qu'il est riche en électrons (aromatiques). Cela explique en partie pourquoi, à concentration en HO[•] égale,

l'incorporation dans la tyrosine est plus faible pour une concentration de vecteur égale à 100 μM , surtout pour les composés aromatiques.

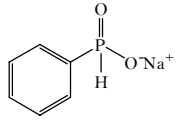
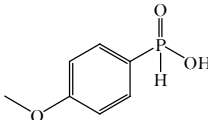
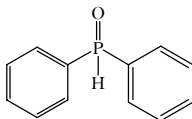
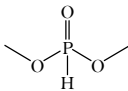
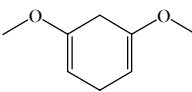
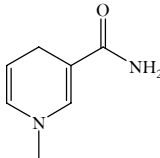
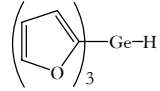
Entrée	Composé	Inc. (%), ($[V]=33 \mu\text{M}$)	Inc. (%), ($[V]=100 \mu\text{M}$)
1		10,7%	6,5% \pm 0,1% (2)
2		8,7%	4,6%
3		9,4%	5,4%
4		12,7%	13,7%
5		12,3%	6,9%
6		11,9%	6,9%
7		12,5%	10,4%

Tableau III-13 : irradiation de la tyrosine avec chacun des différents vecteurs ; $[Y-d_1]=100 \mu\text{M}$, $[\text{HO}\cdot]=760 \mu\text{M}$, $[\text{Pi}]=10 \text{ mM}$, $\text{pH}=7,2$, bullage N_2O

On peut tout de même affirmer que tous les composés, excepté l'acide méthoxyphénylphosphinique et l'oxyde de diphénylphosphine, démontrent une meilleure incorporation sur la tyrosine à une concentration de 33 μM que le sel de l'acide phénylphosphinique. A concentration plus élevée (100 μM) pour laquelle la tyrosine est récupérée de manière plus importante, les meilleurs vecteurs sont le phosphite de diméthyle (entrée 4, Tableau III-13) et le trifurylgermane (entrée 5), malgré sa faible solubilité. Les résultats obtenus avec le phosphite de diméthyle rejoignent ainsi ceux observés par spectroscopie RPE,

Il ressort également que les deux autres composés phosphorés, qui donnaient des résultats encourageants en RPE, possèdent, dans les conditions expérimentales actuelles, un moins bon pouvoir réparateur que le sel de l'acide phénylphosphinique.

IV.6.2.c. Phénomène d'incorporation sans vecteur dans la tyrosine

De manière surprenante, le témoin de ces expériences, i.e. **l'irradiation de tyrosine- d_7 dans H_2O sans vecteur, a montré une incorporation d'hydrogène** (Tableau III-14).

Entrée	$[HO^\bullet]$	Inc. (%) (H_2O)
1	190 μM	1,2%
2	760 μM	12,6%

Tableau III-14 : Irradiation de Y- d_7 sans vecteur; $[Y-d_7]=100 \mu M$, $[Pi]=10 \text{ mM}$, $pH=7,2$, bullage N_2O

Le système inverse, i.e. tyrosine dans 2H_2O , montre le même comportement (Tableau III-15). A part pour $[HO^\bullet]=230 \mu M$ et $[DTT]=50 \mu M$, tous les autres échantillons révèlent une incorporation plus grande dans la tyrosine irradiée dans l'eau lourde en l'absence de DTT qu'avec. Dans le meilleur des cas, l'amélioration de l'incorporation liée à l'introduction de vecteur est faible par rapport à celle observée pour le témoin. Le système sans vecteur est majoritairement plus efficace en ce qui concerne le taux d'incorporation. L'ajout d'un agent de "marquage" apporte comme progrès une moindre dégradation de la tyrosine.

Entrée	$[HO^\bullet]_e$	Inc. (%) (DTT 50 μM)	Inc. (%) (DTT 100 μM)	Inc. (%) sans DTT
1	230 μM	11,2%	0,6%	9,3%
2	760 μM	12,9%	4,7%	28,6%

Tableau III-15 : Irradiation de Y sans vecteur; $[Y]=100 \mu M$, $[Pi]=10 \text{ mM}$, $p^2H=7,2$, bullage N_2O

Ces constatations signifient clairement qu'un phénomène jusque-là inconnu intervient afin d'incorporer du deutérium dans la tyrosine.

Réaliser une échelle de réactivité relative sur la tyrosine s'avère donc être délicat dans ces conditions. C'est pourquoi nous avons éliminé toute source d'hydrogène superflue.

IV.6.2.d. Essai en milieu totalement deutéré

Afin d'éliminer l'introduction d'hydrogène liée au solvant, nous nous sommes placés en milieu totalement deutéré (tyrosine- d_7 dans D_2O), pour que la seule source d'hydrogène provienne du vecteur. Les essais ont été réalisés avec le sel de l'acide phénylphosphinique et le phosphite de diméthyle (Tableau III-16).

Ces résultats sont plutôt positifs même s'ils sont très proches du bruit de fond. En effet, l'incorporation dans le témoin est nulle, ce qui diffère des résultats obtenus dans H_2O d'une part et surtout avec les deux composés phosphorés dans D_2O d'autre part. Dans ce dernier cas,

une amélioration du taux de marquage, certes faible, est observée. En outre, ces expériences à faible concentration en HO• sont très reproductibles. On peut donc affirmer que l'incorporation d'hydrogène provient uniquement de la présence du vecteur, donc que celui-ci remplit pleinement son rôle de réparateur envers l'acide aminé.

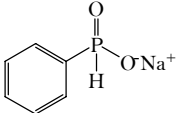
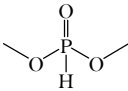
Entrée	Composé	Inc. (%)
1		1,1%
2		0,4%
3	témoin	-0,1%

Tableau III-16 : Irradiation de Y-d dans D₂O; [Y-d]=[vecteur] =100 μM, [²HO•]=760 μM, [Pi]=10 mM, p²H=7,2, bullage N₂O

Conclusion

L'examen de la littérature nous a permis de dresser une liste de composés susceptibles d'être de bons donneurs d'hydrogène pour le radical tyrosyle. Notre choix de molécules s'est majoritairement tourné vers les substances commerciales, même s'il a fallu synthétiser les plus prometteuses d'entre elles. Après vérification de leur solubilité dans l'eau et leur stabilité vis-à-vis des conditions de réaction, la liste s'est restreinte pour l'analyse des composés en RPE.

Ceux-ci présentent, à part l'hydrure d'étain **5**, instable, des comportements d'extinction du radical tyrosyle meilleurs que celui témoigné par le sel de l'acide phénylphosphinique utilisé dans le chapitre II. L'analyse des spectres UV-visible nous a montré qu'en présence de vecteur, la cinétique d'apparition du composé I était modifiée et que l'accumulation du composé II était plus marquée. Ces observations laissent penser à un piégeage du radical tyrosyle par le composé ajouté, bloquant ainsi l'enzyme au niveau du composé II.

A l'analyse de ces résultats, nous avons jugé utile, avant de nous lancer dans la synthèse d'un agent tritié, de mieux connaître la réactivité des radicaux tyrosyle vis-à-vis des structures variées présentées dans la partie I de ce chapitre. Il est en effet possible qu'un produit non testé en RPE, car insoluble, démontre des qualités de réparation étonnantes du radical tyrosyle. La synthèse d'un analogue hydrosoluble pourrait alors être envisagée et le composé ensuite testé en RPE.

Nous nous sommes donc tournés vers la méthode de création de radicaux sur les composés organiques par l'intermédiaire des radicaux hydroxyle. Cette étude n'a pas permis en l'état actuel de discriminer, parmi toutes les structures criblées, laquelle était la meilleure candidate pour la réparation de la tyrosine, en raison de la capacité de celle-ci à incorporer du deutérium sans l'intermédiaire d'un des donneurs choisis.

Cependant, les résultats obtenus en tant que tels sont plutôt prometteurs, même si les conditions d'irradiation mériteraient d'être optimisées. Les derniers résultats en milieu totalement deutéré montrent qu'il y a effectivement incorporation dans la tyrosine, liée uniquement à la présence de l'agent réparateur. Il serait intéressant de cribler tous les acides aminés avec l'ensemble des composés choisis par cette méthode (acide aminé perdeutéré dans l'eau lourde avec un agent de réparation hydrogéné). Ainsi, on pourrait trouver les conditions optimales d'incorporation (en balance avec une dégradation raisonnable), déterminer un meilleur vecteur que le sel de l'acide phénylphosphinique pour réagir avec des radicaux protéiques, par exemple pour l'étude des sites alternatifs d'oxydation (comme c'est le cas ici) ou l'analyse de complexe protéique.

En effet, la molécule qui semblait la plus prometteuse en RPE démontre ici un caractère réparateur moins prononcé que le sel de l'acide phénylphosphinique, agent marqueur que nous avons dû abandonner en raison de sa relative inefficacité vis-à-vis du système BLC-acide peracétique.

A la suite de ces résultats, nous avons voulu nous focaliser sur le mécanisme d'incorporation de deutérium dans la tyrosine qui sous-entend un phénomène d'auto-réparation (chapitre IV). Nous avons estimé qu'il était nécessaire de bien connaître tous les phénomènes qui interviennent au cours de l'irradiation de la tyrosine seule en solution dans l'eau deutérée, avant de mettre au point les paramètres de notre expérience de criblage.

De plus, le phénomène observé est inattendu. Ce dernier, d'une part, remet en cause certains résultats que l'on peut trouver dans la littérature, comme ceux obtenus par Anderson, du moins pour la tyrosine et la leucine.¹⁹ D'autre part, il pourrait expliquer les phénomènes d'introduction de tritium lors de la photo-irradiation de protéines dans l'eau tritiée⁶⁰ ou encore la disparition encore non élucidée des adduits hydroxylés de la tyrosine dans les protéines. En effet, un des principaux produits d'oxydation de protéines irradiées est la dimérisation *via* une dityrosine (réaction intermoléculaire), mais on soupçonne que d'autres processus interviennent, notamment la capture du radical tyrosyle par un phénomène intramoléculaire non déterminé.⁶¹

Bibliographie du chapitre III

- ¹ D. L. J. Clive, W. Yang, A Nitrogen-Containing Stannane for Free Radical Chemistry, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2607-2609.
- ² E. Vedejs, S. M. Duncan, A. R. Haight, An internally activated tin hydride with enhanced reducing ability, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3046-3050.
- ³ X. Han, G. A. Hartmann, A. Brazzale, R. D. Gaston, A water soluble, recyclable organostannatrane, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5837-5839.
- ⁴ J. Light, R. Breslow, A Water Soluble Tin Hydride Reagent, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2957-2958.
- ⁵ R. Rai, D. B. Collum, Reductions and radical cyclizations of aryl and alkyl bromides mediated by NaBH₄ in aqueous base, *Tetrahedron letters* **1994**, *35*, 6221-6224.
- ⁶ B. Giese, A. Dussy, E. Meggers, M. Petretta, U. Schwitter, Conformation, Lifetime, and Repair of 4'-DNA Radicals, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11130-11131.
- ⁷ S. J. Garden, D. V. Avila, A. L. J. Beckwith, V. W. Bowry, K. U. Ingold, J. Luszyk, Absolute Rate Constant for the Reaction of Aryl Radicals with Tri-n-butyltin Hydride, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 805-809.
- ⁸ C. Chatgililoglu, M. Ballestri, J. Escudie, I. Pailhous, Hydrogen Donor Abilities of Germanium Hydrides, *Organometallics* **1999**, *18*, 2395-2397.
- ⁹ T. Nakamura, H. Yorimitsu, H. Shinokubo, K. Oshima, Reduction of Organic Halides with Tri-2-furylgermane: Stoichiometric and Catalytic Reduction, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **2001**, *74*, 747-752.
- ¹⁰ H. Yorimitsu, K. Oshima, Recent advances in the use of tri (2-furyl) germane, triphenylgermane and their derivatives in organic synthesis, *Inorg. Chem. Comm.* **2005**, *8*, 131-142.
- ¹¹ L. J. Johnston, J. Luszyk, D. D. M. Wayner, A. N. Abeywickreyma, A. L. J. Beckwith, J. C. Scaiano, K. U. Ingold, Absolute rate constants for reaction of phenyl, 2,2-dimethylvinyl, cyclopropyl, and neopentyl radicals with tri-n-butylstannane. Comparison of the radical trapping abilities of tri-n-butylstannane and -germane, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4594-4596.
- ¹² H. Fischer, dans *Radical Reaction Rates in Liquids, Landolt-Börnstein New Series*, Springer-Verlag, New York: Heidelberg, **1997**.
- ¹³ P. A. Baguley, J. C. Walton, Flight from the Tyranny of Tin: The Quest for Practical Radical Sources Free from Metal Encumbrances, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3072-3082.
- ¹⁴ A. Studer, S. Amrein, Tin Hydride Substitutes in Reductive Radical Chain Reactions, *Synthesis* **2002**, *2002*, 835-849.
- ¹⁵ J. C. Walton, A. Studer, Evolution of Functional Cyclohexadiene-Based Synthetic Reagents: The Importance of Becoming Aromatic, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 794-802.
- ¹⁶ O. Yamazaki, H. Togo, G. Nogami, M. Yokoyama, Novel Water-Soluble Organosilane Compounds as a Radical Reducing Agent in Aqueous Media, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1997**, *70*, 2519-2523.
- ¹⁷ B. P. Roberts, Polarity-reversal catalysis of hydrogen-atom abstraction reactions: concepts and applications in organic chemistry, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 25-35.
- ¹⁸ M. B. Goshe, Y. H. Chen, V. E. Anderson, Identification of the Sites of Hydroxyl Radical Reaction with Peptides by Hydrogen/Deuterium Exchange: Prevalence of Reactions with the Side Chains, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1761-1770.
- ¹⁹ B. N. Nukuna, M. B. Goshe, V. E. Anderson, Sites of Hydroxyl Radical Reaction with Amino Acids Identified by ²H NMR Detection of Induced ¹H/²H Exchange, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1208-1214.
- ²⁰ D. H. R. Barton, D. O. Jang, J. C. Jaszberenyi, The invention of radical reactions. Part 32. Radical deoxygenations, dehalogenations, and deaminations with dialkyl phosphites and hypophosphorous acid as hydrogen sources, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6838-6842.
- ²¹ D. H. R. Barton, D. O. Jang, J. C. Jaszberenyi, Radical deoxygenations and dehalogenations with dialkyl phosphites as hydrogen atom source, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2311-2314.

- 22 D. O. Jang, Hypophosphorous Acid Mediated Dehalogenation in Water, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5367-5368.
- 23 T. A. Khan, R. Tripoli, J. J. Crawford, C. G. Martin, J. A. Murphy, Diethylphosphine Oxide (DEPO): High-Yielding and Facile Preparation of Indolones in Water, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2971-2974.
- 24 J. A. Murphy, R. Tripoli, T. A. Khan, U. W. Mali, Novel Phosphorus Radical-Based Routes to Horsfiline, *Org. Lett.* **2005**, 7, 3287-3289.
- 25 D. H. Cho, D. O. Jang, Carbon-Carbon Bond Formation by Cyclization of Dienes Using Phosphorus-Centered Radicals in Water, *Synlett* **2005**, 8, 59-62.
- 26 R. G. Kryger, J. P. Lorand, N. R. Stevens, N. R. Herron, Radicals and scavengers. 7. Diffusion controlled scavenging of phenyl radicals and absolute rate constants of several phenyl radical reactions, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 7589-7600.
- 27 D. M. Smith, M. E. Pulling, J. R. Norton, Tin-Free and Catalytic Radical Cyclizations, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 770-771.
- 28 S. Mikami, K. Fujita, T. Nakamura, H. Yorimitsu, H. Shinokubo, S. Matsubara, K. Oshima, Triethylborane-Induced Radical Reactions with Gallium Hydride Reagent HGaCl₂, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1853-1855.
- 29 T. Miyai, K. Inoue, M. Yasuda, I. Shibata, A. Baba, Preparation of a Novel Indium Hydride and Application to Practical Organic Synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1929-1932.
- 30 K. Inoue, A. Sawada, I. Shibata, A. Baba, Indium(III) Chloride-Sodium Borohydride System: A Convenient Radical Reagent for an Alternative to Tributyltin Hydride System, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 906-907.
- 31 K. Fujita, T. Nakamura, H. Yorimitsu, K. Oshima, Triethylborane-Induced Radical Reaction with Schwartz Reagent, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3137-3138.
- 32 P. Andreoletti, S. Gambarelli, G. Sainz, V. Stojanoff, C. White, G. Desfonds, J. Gagnon, J. Gaillard, H. M. Jouve, Formation of a Tyrosyl Radical Intermediate in *Proteus mirabilis* Catalase by Directed Mutagenesis and Consequences for Nucleotide Reactivity, *Biochemistry* **2001**, 40, 13734-13743.
- 33 X. Q. Zhu, H. R. Li, Q. Li, T. Ai, J. Y. Lu, Y. Yang, J. P. Cheng, Determination of the C₄-H Bond Dissociation Energies of NADH Models and Their Radical Cations in Acetonitrile, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 871-880.
- 34 M. F. Powell, T. C. Bruice, Hydride vs. electron transfer in the reduction of flavin and flavin radical by 1,4-dihydropyridines, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1014-1021.
- 35 S. Fukuzumi, O. Inada, T. Suenobu, Mechanisms of Electron-Transfer Oxidation of NADH Analogues and Chemiluminescence. Detection of the Keto and Enol Radical Cations, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4808-4816.
- 36 A. Ohno, T. Shio, H. Yamamoto, S. Oka, Reduction by a model of NAD(P)H. 30. Proof for the electron-proton-electron-transfer mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2045-2048.
- 37 A. Ohno, H. Yamamoto, S. Oka, Reduction by a model of NAD(P)H. 29. Kinetics and isotope effects for the reduction of substituted trifluoroacetophenone, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2041-2045.
- 38 V. N. Gevorgyan, L. M. Ignatovich, E. Lukevics, Reduction of alkoxysilanes, halo-silanes and-germanes with lithium aluminium hydride under phase-transfer conditions, *J. Organomet. Chem.* **1985**, 284, c31-c32.
- 39 T. Nakamura, H. Yorimitsu, H. Shinokubo, K. Oshima, Reduction of Organic Halides with Tri-2-Furanylgermane: Stoichiometric and Catalytic Reaction, *Synlett* **1999**, 9, 1415-1416.
- 40 S. R. Breining, R. K. Boeckman, A water-soluble tin hydride : tris[3-(2-methoxyethoxy)propyl]stannane, *Org. Synth.* **1995**, 72, 199-204.
- 41 A. Deisseroth, A. L. Dounce, Catalase : Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role, *Physiol. Rev.* **1970**, 50, 319-375.
- 42 B. Chance, The Spectra of the Enzyme-Substrate Complexes of Catalase and Peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* **1952**, 41, 404-415.
- 43 H. M. Jouve, J. Gaillard, J. Pelmont, Characterization and Spectral Properties of *Proteus Mirabilis* Catalase, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1984**, 62, 935-944.
- 44 A. Ivancich, H. M. Jouve, B. Sartor, J. Gaillard, EPR Investigation of Compound I in *Proteus mirabilis* and Bovine Liver Catalases: Formation of Porphyrin and Tyrosyl Radical Intermediates, *Biochemistry* **1997**, 36, 9356-9364.
- 45 M. B. Goshe, V. E. Anderson, Hydroxyl Radical-Induced Hydrogen/Deuterium Exchange in Amino Acid Carbon-Hydrogen Bonds, *Radiat. Res.* **1999**, 151, 50-58.

-
- ⁴⁶ J. S. Sharp, J. M. Becker, R. L. Hettich, Protein surface mapping by chemical oxidation: structural analysis by mass spectrometry, *Anal. Biochem.* **2003**, *313*, 216-225.
- ⁴⁷ J. S. Sharp, J. M. Becker, R. L. Hettich, Analysis of protein solvent accessible surfaces by photochemical oxidation and mass spectrometry, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 672-683.
- ⁴⁸ B. Bohn, Formation of peroxy radicals from OH-toluene adducts and O₂, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 6092-6101.
- ⁴⁹ S. D. Maleknia, C. Y. Ralston, M. D. Brenowitz, K. M. Downard, M. R. Chance, Determination of Macromolecular Folding and Structure by Synchrotron X-Ray Radiolysis Techniques, *Anal. Biochem.* **2001**, *289*, 103-115.
- ⁵⁰ J. W. Wong, S. D. Maleknia, K. M. Downard, Hydroxyl radical probe of the calmodulin-melittin complex interface by electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 225-233.
- ⁵¹ G. Xu, M. R. Chance, Radiolytic Modification and Reactivity of Amino Acid Residues Serving as Structural Probes for Protein Footprinting, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4549-4555.
- ⁵² T. N. Das, Redox Chemistry of 3-Iodotyrosine in Aqueous Medium, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 426-433.
- ⁵³ M. J. Davies, R. T. Dean, dans *Radical-mediated Protein Oxidation: From Chemistry to Medicine*, Oxford University Press Oxford, **1997**.
- ⁵⁴ I. Cudina, L. Josimovic, The Effect of Oxygen on the Radiolysis of Tyrosine in Aqueous Solutions, *Radiat. Res.* **1987**, *109*, 206-215.
- ⁵⁵ B. Hickel, G. Baldacchino, dans *Actions Biologique et Chimique des Rayonnements Ionisants, une introduction*, Nauwelaerts (Editions), Frison-Roche Edition ed.; Tilquin, B, **2001**.
- ⁵⁶ W. R. Gray, End-group Analysis using Dansyl Chloride, *Methods Enzymol.* **1972**, *25*, 121-138.
- ⁵⁷ L. Carlsson, I. Sjöholm, Synthesis of tritium-labelled oxytocin and lysine-vasopressin, *Acta Chem. Scand.* **1966**, *20*, 259-260.
- ⁵⁸ G. Mousseau, Caractérisation des interactions protéine-ligand par échange ¹H/³H, *Thèse de doctorat*, Paris XI, **2007**.
- ⁵⁹ V. E. Anderson, conversation personnelle, **2006**.
- ⁶⁰ L. A. Holt, B. Milligan, The labelling of proteins by irradiation in tritiated water, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *264*, 432-439.
- ⁶¹ M. Audette, Y. Blouquit, C. Houee-Levin, Oxidative Dimerization of Proteins: Role of Tyrosine Accessibility, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 217-220.

Chapitre IV. Phénomène d'autoréparation de la tyrosine

Ce chapitre détaille les expériences de radiolyse entreprises sur la tyrosine afin de déterminer quel est le mécanisme permettant l'incorporation en deutérium de la tyrosine quand celle-ci est soumise à l'action des radicaux hydroxyle.

Dans un premier temps, nous rappellerons les phénomènes de radiolyse appliqués à la tyrosine, ou plus largement aux phénols, décrivant notamment les produits de dégradation et les phénomènes de régénération de la tyrosine. Puis, dans la partie II, nous étudierons les observations constatées lors des expériences de radiolyse sur l'acide aminé irradié seul. Puis, en modifiant les conditions de réaction, nous expliciterons le phénomène considéré : l'autoréparation de la tyrosine, pour lequel nous proposerons un mécanisme.

I. Rappels bibliographiques : dégradation et régénération de la tyrosine

Dans cette partie, nous appréhenderons la chimie de la tyrosine soumise aux espèces issues de la radiolyse, et plus particulièrement son comportement vis-à-vis du radical hydroxyle. La compréhension des mécanismes intervenant est indispensable pour celui qui souhaite étudier l'implication de la tyrosine dans la biochimie des enzymes, la photosynthèse, comme cela a été décrit lors du chapitre I, mais aussi la neurochimie, car cet acide aminé est un précurseur de la dopamine, de l'épinéphrine et d'autres neurotransmetteurs.

D'autre part, certaines études ayant dévoilé des mécanismes qui permettraient à la tyrosine de se régénérer seront présentées.

I.1. Réaction des radicaux hydroxyle avec les phénols

La majorité des travaux conduits sur la réaction des radicaux hydroxyle avec la tyrosine examine les produits obtenus en présence d'oxygène, mais tous les mécanismes ne sont pas expliqués. C'est pourquoi il faut se tourner vers la radiolyse des phénols, en particulier du *p*-crésol, analogue de la tyrosine.

I.1.1. Détermination des espèces radicalaires formées sur la tyrosine

Solar *et al.* ont identifié, par radiolyse pulsée et spectrométrie UV-visible ultrarapide, les intermédiaires radicalaires obtenus par réaction des radicaux hydroxyle avec le cycle

benzénique de la tyrosine en milieu anaérobie à pH neutre.¹ Les réactions avec la chaîne latérale sont considérées comme étant négligeables à l'analyse des constantes de vitesses de OH^\bullet sur l'alanine (analogue de la partie acide aminé de la tyrosine) et sur le méthyle du toluène qui sont estimées égales à $7,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $4,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement.

Le radical hydroxyle réagit majoritairement par addition sur le cycle (95%). Le reste constitue l'arrachage de l'hydrogène phénolique (5%), (Schéma IV-1). Les adduits *ortho*- (50%) et *méto*-hydroxylés (35%) sont majoritaires. Les constantes de vitesses de toutes les réactions intervenant lors de la radiolyse de solutions aqueuses de tyrosine sont données dans le Tableau IV-1.

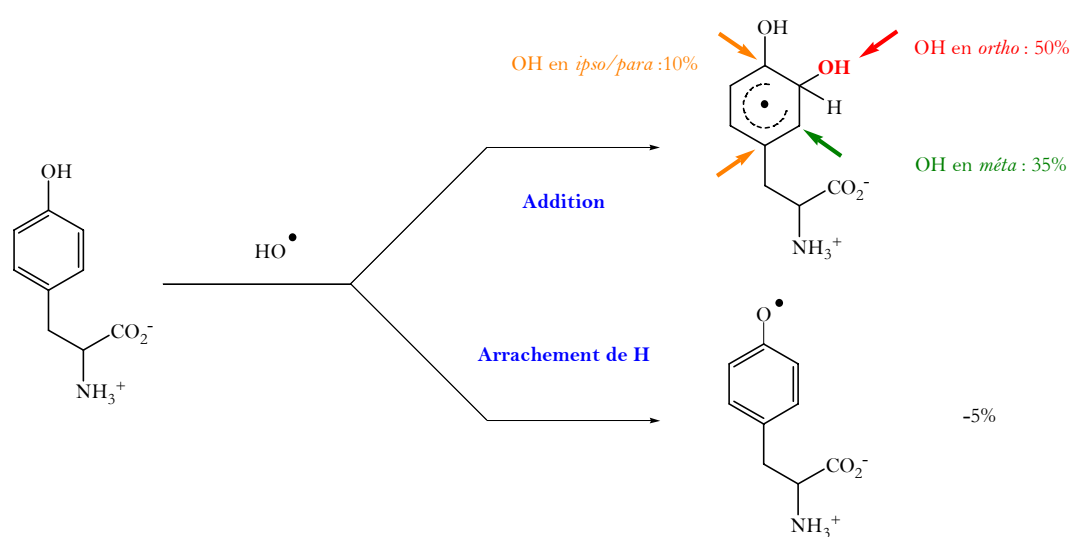


Schéma IV-1 : Intermédiaires obtenus lors de la réaction des radicaux hydroxyle sur la tyrosine

L'adduit *ortho*-hydroxylé est le produit qui élimine le plus facilement une molécule d'eau pour conduire au radical phénoxyle (Schéma IV-2). La cinétique de cette réaction est bien plus lente que celle de l'addition de OH^\bullet (Tableau IV-1, entrée 8 *vs* entrée 1).

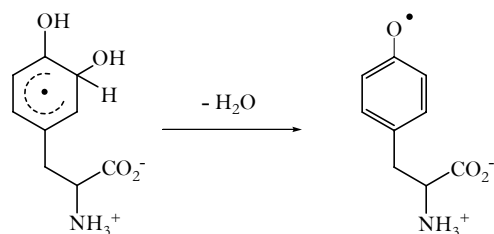


Schéma IV-2 : formation du radical phénoxyle à partir du radical cyclohexadiényle correspondant

Cette réaction est en compétition avec la recombinaison du radical, soit par dimérisation, soit par dismutation.

Entrée	Réaction	$k (M^{-1}.s^{-1})$
1	$Tyr-OH + OH^{\bullet} \rightarrow [Tyr-(OH)_2]^{\bullet} \text{ ortho}$	$7,0 \times 10^9$
2	$Tyr-OH + OH^{\bullet} \rightarrow [Tyr-(OH)_2]^{\bullet} \text{ méta}$	$5,0 \times 10^9$
3	$Tyr-OH + OH^{\bullet} \rightarrow Tyr-O^{\bullet} + H_2O$	$6,0 \times 10^8$
4	$Tyr-OH + OH^{\bullet} \rightarrow [Tyr-(OH)_2]^{\bullet} \text{ ipso, para, chaîne latérale}$	$1,4 \times 10^9$
5	$Tyr-OH + H^{\bullet} \rightarrow [H-Tyr-OH]^{\bullet}$	$8,8 \times 10^8$
6	$2 [H-Tyr-OH]^{\bullet} \rightarrow \text{produits}$	$1,0 \times 10^9$
7	$2 [Tyr-(OH)_2]^{\bullet} \text{ ortho} \rightarrow \text{produits de dimérisation et/ou dismutation}$	$1,5 \times 10^8$
8	$2 [Tyr-(OH)_2]^{\bullet} \text{ méta} \rightarrow \text{produits de dimérisation et/ou dismutation}$	$7,0 \times 10^9$
9	$[Tyr-(OH)_2]^{\bullet} \text{ ortho} \rightarrow Tyr-O^{\bullet} + H_2O$	$1,8 \times 10^4$
10	$2 Tyr-O^{\bullet} \rightarrow \text{produits de dimérisation et/ou dismutation}$	$2,0 \times 10^8$
11	$Tyr-OH + e_{aq}^{-} \rightarrow \text{espèce transitoire } T$	$2,8 \times 10^8$
12	$2 T \rightarrow \text{produits}$	$3,4 \times 10^8$
13	$2 OH^{\bullet} \rightarrow H_2O_2$	$1,2 \times 10^{10}$
14	$OH^{\bullet} + e_{aq}^{-} \rightarrow OH^{-}$	$2,2 \times 10^{10}$
15	$2 e_{aq}^{-} + 2 H_2O \rightarrow H_2 + 2 OH^{-}$	$0,5 \times 10^{10}$
16	$H^{\bullet} + e_{aq}^{-} + H_2O \rightarrow H_2 + OH^{-}$	$2,5 \times 10^{10}$
17	$2 H^{\bullet} \rightarrow H_2$	$1,6 \times 10^{10}$
18	$OH^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow H_2O$	$2,0 \times 10^{10}$
19	$H^{+} + e_{aq}^{-} \rightarrow H^{\bullet}$	$2,3 \times 10^{10}$

Tableau IV-1 : valeurs des constantes de vitesse pour les réactions intervenant sur le cycle aromatique lors de la radiolyse d'une solution aqueuse de tyrosine, référence 1

I.1.2. Devenir des intermédiaires

I.1.2.a. Détermination de la structure par oxydation

Afin de mieux sonder la nature et la proportion relative des intermédiaires observés lors de l'attaque des radicaux hydroxyle sur les phénols, des oxydants forts organiques comme des quinones, ou inorganiques comme $Fe(CN)_6^{3-}$ ont été employés et permettent de visualiser les intermédiaires formés.² Comme le radical hydroxyle est un électrophile puissant et qu'il s'additionne à des vitesses contrôlées par la diffusion, la distribution des produits obtenue est une bonne image de la distribution des charges sur le cycle.

La réaction entre le radical cyclohexadiényle et l'oxydant conduit à des molécules de type dihydroxybenzène (différents régioisomères). Le groupement hydroxyle activant les

positions *ortho* et *para*, ce sont majoritairement ces régioisomères qui sont formés.

La même étude a été entreprise sur les crésols considérés comme des systèmes modèles de la tyrosine.^{3,4} L'effet du groupement méthyle, étudié lors de l'hydroxylation du toluène, est moindre, mais les mêmes régiosélectivités sont observées.⁵

Les produits d'hydroxylation du *p*-crésol et du phénol, ainsi que les proportions de chacun sont résumés dans le Tableau IV-2.



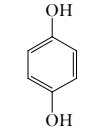
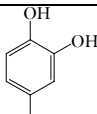
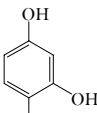
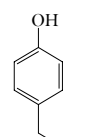
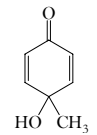
<i>Substrat</i>	<i>Produits</i>	<i>Site d'attaque de HO•</i>	<i>Formule</i>	<i>Rendement</i>
<i>Phénol</i>	Catéchol	<i>ortho</i>		$1,48 \times 2$ (48%)
	Résorcinol	<i>méta</i>		$0,22 \times 2$ (8%)
	Hydroquinone	<i>para</i>		2,14 (36%)
<i>p</i> -crésol	4-méthyl-catéchol	<i>ortho</i>		$1,55 \times 2$ (53%)
	4-méthyl-résorcinol	<i>méta</i>		$0,80 \times 2$ (27%)
	Alcool <i>p</i> -hydroxybenzylique	<i>méthyle</i>		0,55 (9%)
	<i>p</i> -diènone	<i>para</i>		0,60 (10%)

Tableau IV-2 : rendement chimique radicalaire des adduits hydroxyles du phénol et *p*-crésol
(rendement total 5,85)⁺⁺⁺

Il est à noter que pour le phénol, la position *para* est primordiale, alors que pour la tyrosine, cette position est très peu hydroxylée en raison de l'encombrement stérique. Cette tendance est retrouvée pour le crésol. L'effet directeur du méthyle est tout de même important à l'analyse de l'augmentation de l'hydroxylation en *méta*. En revanche, ici, on observe de l'hydroxylation sur la pseudo chaîne latérale et la formation d'une diènone.⁶

⁺⁺⁺ Les chiffres entre parenthèses indiquent la fraction de chaque site attaqué par HO•. Pour la position *ipso* du phénol, ce chiffre est de 8%.

Les réactions de transfert d'électron entre radicaux phénoxyle, conduisant à la formation d'hydroquinone sont des processus mineurs. Ils ne sont pas thermodynamiquement favorisés en raison des valeurs des potentiels rédox ($E(\text{PhO}^\bullet/\text{PhO}^-)$ sont de 23 et 700 mV pour l'hydroquinone et le phénol respectivement à pH 13).⁷

Ces résultats nous permettent donc de relier les données obtenues sur les analogues avec celles observées par l'équipe de Solar.¹ Des calculs théoriques visant à modéliser l'attaque des radicaux hydroxyle sur le phénol ont confirmé les observations expérimentales à propos des vitesses de réaction, celles limitées par la diffusion de l'addition de HO^\bullet et de l'arrachement d'un hydrogène et celle plus lente d'élimination d'une molécule d'eau.⁸

I.1.2.b. Détermination de la densité de spin des radicaux formés intermédiairement sur des analogues de la tyrosine

La Figure IV-1 représentent les structures des analogues de la tyrosine utilisés lors de la partie résultats, i.e. la O-méthyle tyrosine (OMT), le *p*-crésol et le *N*-acétyl tyrosinamide (NAYA).

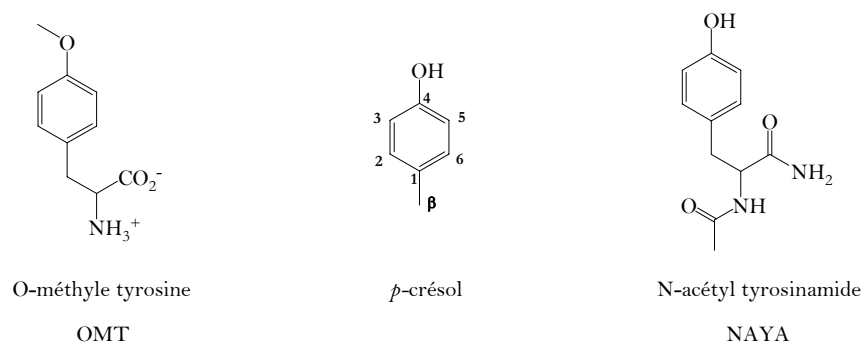


Figure IV-1 : structures des analogues de la tyrosine étudiés.

Les densités de spin calculées pour ces molécules sont déterminées soit expérimentalement, soit par modélisation, et sont données dans le Tableau I-3. Les valeurs pour OMT n'ont pas été déterminées : ce sont celles du 4-méthyl-anisole (*p*-Me-Ph-OMe) qui sont indiquées.

Entrée	Substrat	C_1	$C_{2,6}$	$C_{3,5}$	C_4	O	C_{β^*}
1	Y libre ⁹	0,32	-0,04	0,23	0,05	0,26	-
2	<i>p</i> -crésol ¹⁰	0,40	-0,16	0,31	-0,11	0,43	-0,03
3	<i>p</i> -Me-Anisole ¹¹	-0,09	0,18	-0,06	0,18	-	0,62
4	NAYA ¹²	0,39	-0,06	0,25 & 0,26	0,04	0,17	-

Tableau IV-3 : distribution des densités de spin du radical tyrosyle et de ses analogues

On constate que lorsque le carbone 4 porte un méthoxy, toute la distribution de la densité de spin est modifiée. En revanche, la distribution de spin sur les carbones *ortho* et *méta* est quasiment la même pour la tyrosine et NAYA.

I.1.3. Nature des produits stables issus de la radiolyse de la tyrosine

I.1.3.a. En l'absence d'oxygène

Les différents intermédiaires peuvent se recombinaison par dismutation ou dimérisation en l'absence d'oxygène. Notamment, on observe de la dityrosine par recombinaison du radical tyrosyle.¹³

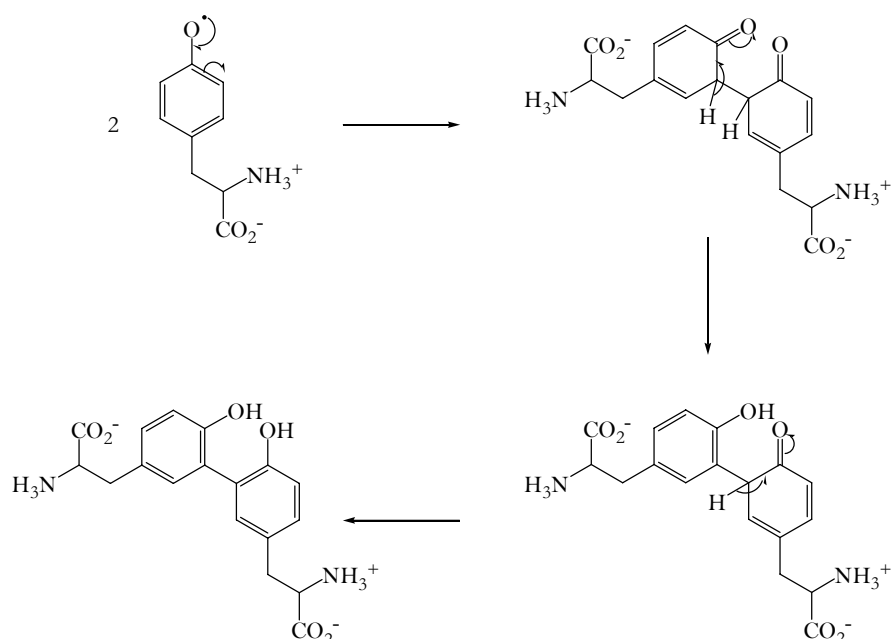


Schéma IV-3 : mécanisme de formation de dityrosine

Des oligomères de poids moléculaires plus importants, comme la 3,3',5',3''-trityrosine et la pulchérosine, qui sont des molécules colorées fluorescentes, peuvent également être observées.

Un autre produit est observé à plus faible taux : la 3,4-dihydroxyphénylalanine, dont le mécanisme de formation est proposé ci-dessous.¹⁴

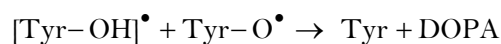
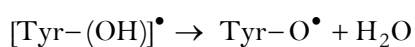


Schéma IV-4 : formation de la 3,4-DOPA

Le rendement de formation de la 3,4-DOPA est inférieur à 0,1 en solution désoxygénée (rendement de production de e^-_{aq} et HO^\bullet est de 2,8 molécules pour 100 eV absorbés).¹⁴

I.1.3.b. En présence d'oxygène

En milieu aérobie, les adduits hydroxylés vont réagir avec l'oxygène, mais pas le radical phénoxy. Le produit majoritaire obtenu est la 3,4-DOPA, dont le mécanisme de formation est explicité sur le Schéma IV-5. De la 2,4-DOPA apparaît sous forme de traces.¹⁵ En solution aérée, le rendement de formation de DOPA est de 2,5 à pH 7.

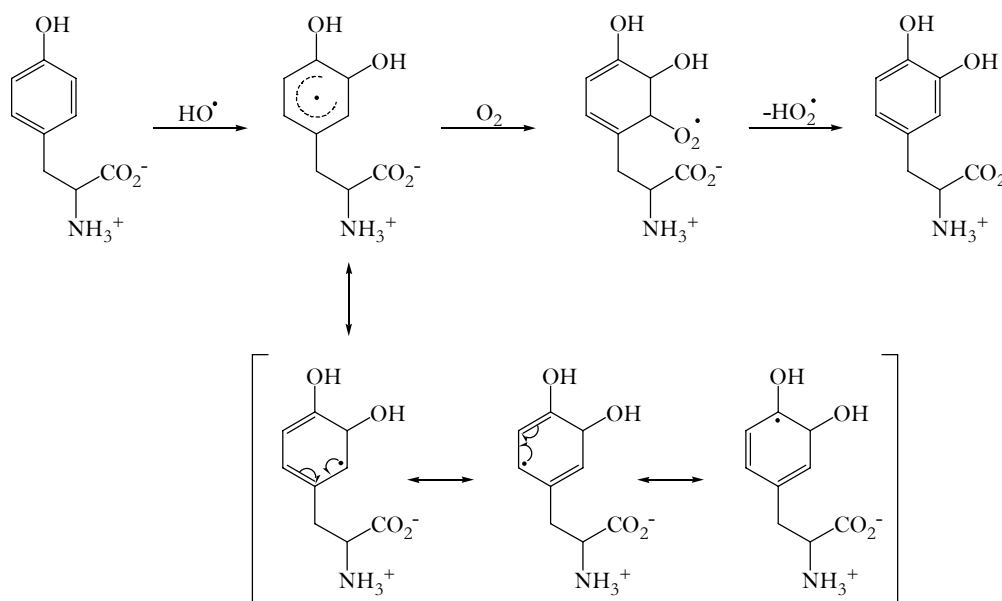


Schéma IV-5 : formation de la 3,4-DOPA

La formation de DOPA engendre la formation de peroxyde d'hydrogène, par perte du radical HO_2^\bullet , qui se dismute en H_2O_2 et O_2 (Schéma IV-6). Ces mêmes espèces (O_2^\bullet et HO_2^\bullet), sont créées par réaction entre l'oxygène et les espèces réductrices, l'électron solvaté et le radical H^\bullet .

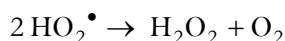


Schéma IV-6 : dismutation du radical HO_2^\bullet

A pH faiblement acide ou neutre, la quantité de DOPA qui apparaît correspond à la quantité de tyrosine qui disparaît, ceci en corrélation avec la quantité de radicaux hydroxyle produits. Cela signifie que tout les adduits de type $Tyr-OH^\bullet$ réagissent avec l'oxygène. Ces résultats concordent avec le fait que la formation du radical phénoxy par perte d'une molécule d'eau est beaucoup plus lente à pH neutre que la formation de radicaux peroxyde ($k=1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

En revanche, le taux de DOPA formé est quasiment nul au-delà de pH 9. A la place, il se forme des composés de degré d'oxydation supérieur comme le dopachrome et un précipité noir de mélanine (Schéma IV-7).¹⁶

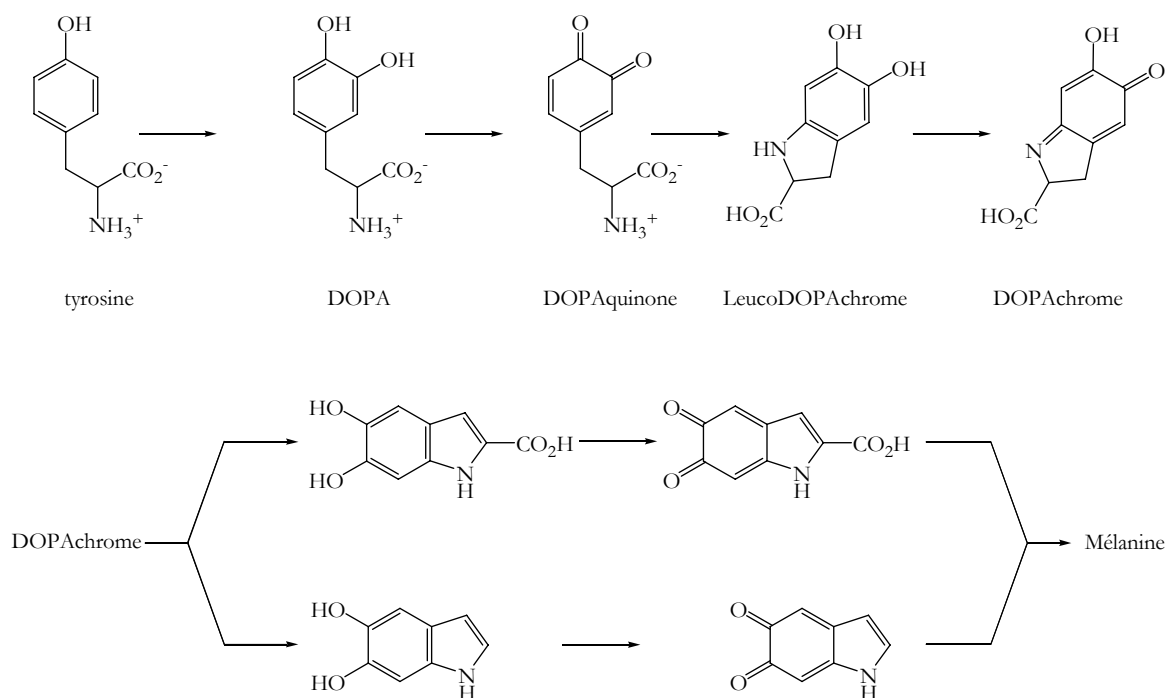


Schéma IV-7 : biosynthèse de l'hétéropolymère mélanine

I.2. Régénération de la tyrosine

Des voies de régénération de la tyrosine *in vivo*, qu'elles soient enzymatiques ou chimiques, sont détaillées dans la littérature. La majorité de ces phénomènes est étudiée par spectrophotométrie UV-visible résolue en temps, combinée à la radiolyse pulsée. L'apparition ou l'extinction des bandes d'absorption permettent de visualiser les radicaux formés transitoirement, pour des échelles de temps de l'ordre de la dizaine de μ s, puis par traitement cinétique des données.

Deux études s'appuient sur une approche mécaniste par introduction de deutérium. La première est la méthode publiée par Anderson, déjà décrite au chapitre I. L'autre est initiée par photolyse d'une solution de tyrosine. Ce sont ces travaux que nous expliciterons.

I.2.1. Réaction avec le radical superoxyde

L'anion superoxyde réagit avec de nombreux radicaux, en particulier le radical tyrosyle, avec des vitesses proches de la diffusion, pour régénérer la tyrosine plutôt que de la laisser former un dimère de tyrosine (Schéma IV-8).¹⁷ Le processus est un transfert d'électron

(réduction) du superoxyde vers le radical tyrosyle.

En revanche, le phénomène d'addition sur le cycle reste majoritaire. Dans ce cas, il se forme intermédiairement un hydroperoxyde qui donne, par réarrangement, différents produits d'oxydation. Les auteurs constatent que 75% de la tyrosine est consommée pour la réaction d'addition, en compétition avec la réaction de réparation de la tyrosine. Dans les systèmes biologiques, le composé hydroperoxyde a été détecté comme le produit principal dans les cas où à la fois l'anion superoxyde et le radical tyrosyle sont générés (resp. par la xanthine oxydase et la myeloperoxydase).

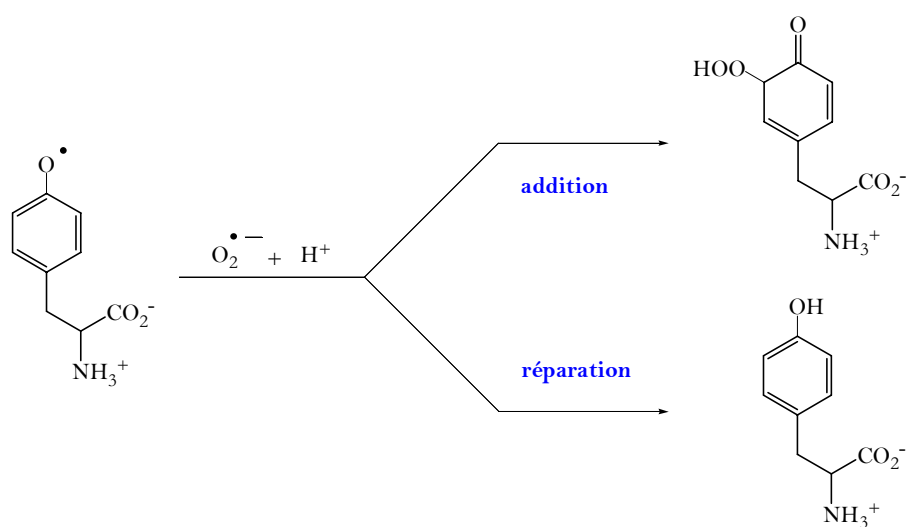


Schéma IV-8 : réaction du radical tyrosyle avec l'anion superoxyde

L'addition de H^\bullet sur la tyrosine, puis d' O_2 conduit à la formation d'adduits $Tyr-HO_2^\bullet$. Ce dernier réagit avec $O_2^{\bullet-}$, régénérant la tyrosine et libérant une molécule de peroxyde d'hydrogène.

I.2.2. Réaction avec des enzymes

La tyrosinase est une enzyme catalysant l'oxydation de la tyrosine et de la DOPA en DOPAquinone, qui elle se dismute en DOPA et DOPochrome (Schéma IV-7). Cette protéine est capable de réduire en tyrosine le radical tyrosyle généré par irradiation lumineuse ou par réaction entre la peroxydase de raifort et le peroxyde d'hydrogène.¹⁸

I.2.3. Réaction avec les antioxydants classiques

Les radicaux tyrosyle générés par irradiation γ d'une solution de lysozyme sont efficacement réparés par les antioxydants comme l'acide urique, l'acide ascorbique, le sésamol et le n-propyl gallate, alors qu'en leur absence, la formation de dityrosine est observée.¹⁹

Les constantes de vitesse observées pour la réaction de réparation du radical tyrosyle, $\text{Tyr-O}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{Tyr-OH} + \text{A}^\bullet$ sont de 5,4 et $11,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'acide urique et l'acide ascorbique respectivement.

Sur ce système, l' α -tocophérol, en dépit de son caractère antioxydant démontré, n'est pas efficace en raison de son manque de solubilité dans l'eau. En revanche, si un de ses analogues hydrosolubles, le trolox C, est utilisé, le radical tyrosyle est très rapidement réparé ($3,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Ces résultats suggèrent qu'une des fonctions de l' α -tocophérol *in vivo* pourrait être la réparation des radicaux formés de manière non contrôlée sur les protéines membranaires au sein de la bicouche lipidique.²⁰

I.2.4. Photolyse de la tyrosine

En solution désaérée, il y a production de radicaux hydroxyle et d'électron aqueux. Un mécanisme proposé pour la régénération de la tyrosine est décrit ci-dessous. La réaction entre l'adduit hydroxylé de la tyrosine et le radical anion régénère la tyrosine.¹⁵

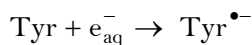
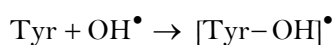


Schéma IV-9 : régénération de la tyrosine lors de la radiolyse de solution dégazée à l'argon.

Gabel et London ont démontré que les hydrogènes portés par le cycle aromatique de la tyrosine sont labiles photochimiquement et s'échangent avec des deutérons lorsque la tyrosine est photolysée dans l'eau lourde. La position *méta* est le site préférentiel de deutération.²¹

Aucune modification de la chaîne latérale n'est reportée. Le fait qu'aucun changement significatif n'apparaît sur les positions β élimine le passage par un intermédiaire quinone décrit à la fois par Anderson²² et Lukeman²³ (Schéma IV-10).

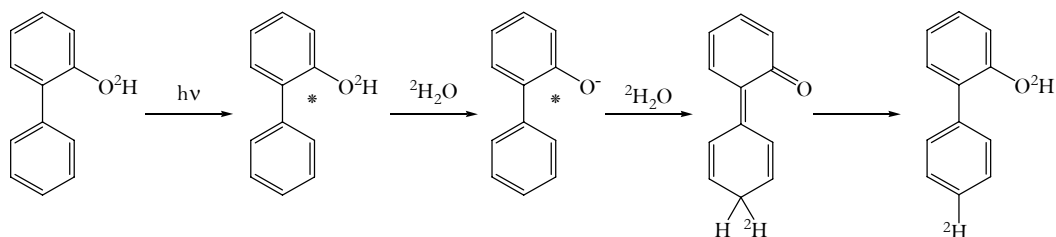


Schéma IV-10 : incorporation de deutérium sur un biaryle via la formation d'une quinone

L'influence du pH est telle que le maximum d'incorporation a lieu à pH 9 et est

beaucoup plus faible à pH acide. A pH 2, on observe non seulement une très faible deutération du cycle mais aussi une forte dégradation de la tyrosine.

Ces résultats impliquent que le mécanisme de deutération initiée par irradiation UV est différent de celui observé lors de l'échange acido-catalysé, qui, lui, est plutôt sélectif de la position *ortho* (excepté la deutération du 4-hydroxybenzoate obtenu par catalyse au rhodium).²⁴ En effet, la réaction entre un dérivé hormonal aromatique et $\text{CF}_3\text{CO}_2^2\text{H}$ conduit à la dideutération du cycle aromatique. En revanche, aucune deutération du noyau benzénique n'est observée en présence d'une base forte comme le méthanolate de sodium.²⁵

L'échange photochimique est fortement stimulé par le groupement amine porté par le carbone chiral. En effet, *p*-crésol et tyrosine n'affichent pas du tout le même comportement face à l'irradiation, à en juger par la faible incorporation de deutérium dans le *p*-crésol.

L'irradiation de *m*-tyrosine et la deutération majoritaire en *méta* du groupement hydroxyle indiquent que le facteur déterminant le site préférentiel de deutération est la position relative du groupement hydroxyle et non la proximité du groupement ammonium.

Les auteurs montrent que le mécanisme d'échange proposé repose sur la formation d'un radical cyclohexadiényle provenant de la réaction entre la tyrosine et l'électron aqueux. La réaction d'échange résulte de deux rôles distincts de la tyrosine. Le premier est la transduction d'énergie lumineuse en électron aqueux. Le second est une molécule accepteur d'électron formant un intermédiaire radicalaire anionique rapidement protoné en radical cyclohexadiényle (Schéma IV-11). Cette étape est analogue à la réaction de Birch en chimie organique où les substrats aromatiques captent un électron provenant d'un métal alcalin pour former un radical anionique, puis, par protonation, donne un radical cyclohexadiényle.

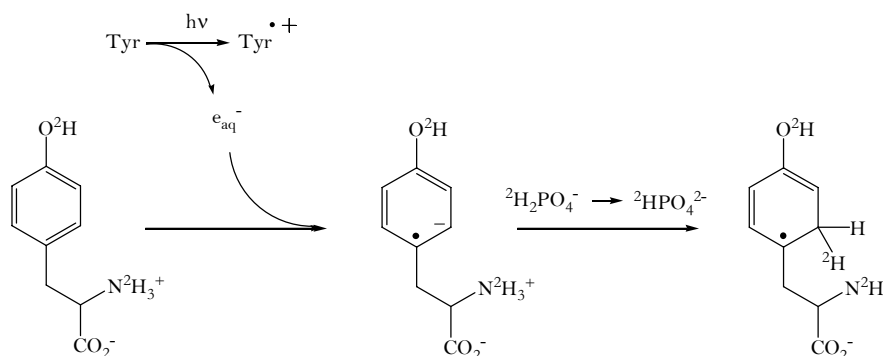


Schéma IV-11 : formation du radical cyclohexadiényle

Des travaux concernant la régénération de l'iodotyrosine à pH alcalin ($\text{pH} > \text{pK}_a$) ont été publiés par Das *et coll.*^{26,27} Le radical cyclohexadiényle se déprotonne et est oxydé par le radical phénoxy généré photochimiquement. A partir des données expérimentales, combinées au mécanisme proposé par Das, les auteurs proposent le mécanisme suivant

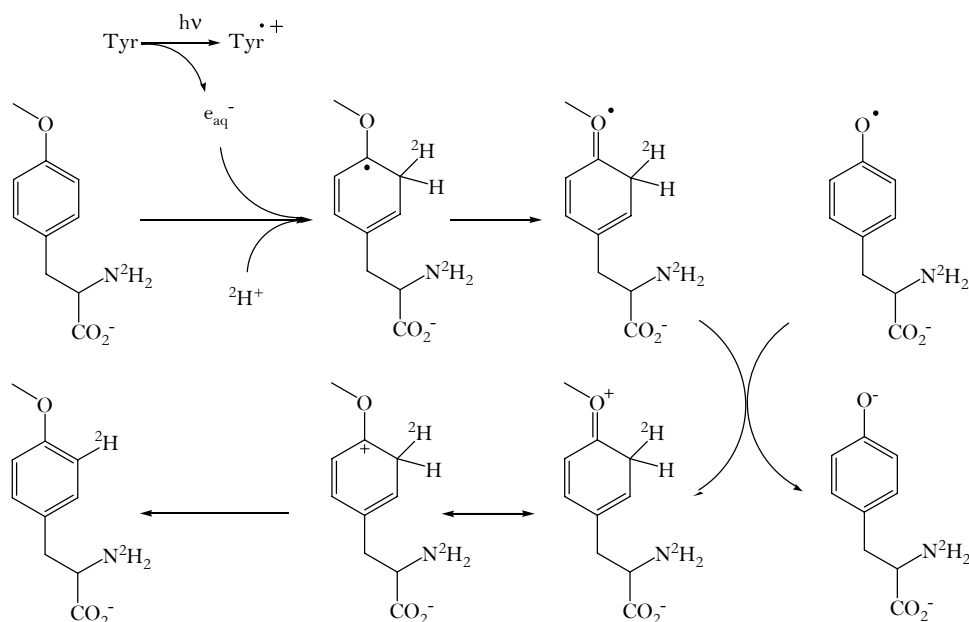
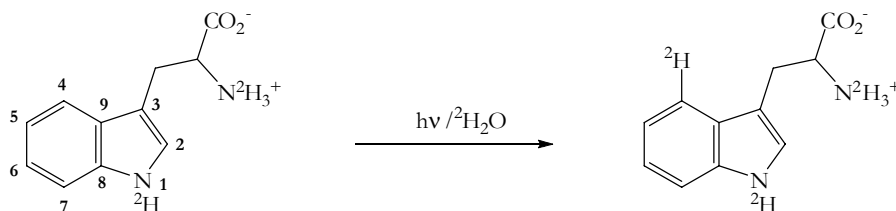


Schéma IV-13 : deutération de la tyrosine O-méthylée

Un phénomène analogue a été observé pour le tryptophane irradié dans l'eau lourde (Schéma IV-14). On observe également de l'incorporation de deutérium à la position C4 avec modification du signal du proton en position 5. Le mécanisme de deutération régiosélectif implique un transfert de proton du groupement ammonium quaternaire vers la position C4.²⁸

Schéma IV-14 : échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ via la photolyse du tryptophane

II. Autoréparation de la tyrosine

L'ensemble de ces expériences a pu être réalisé grâce à la collaboration avec Jean-Philippe Renault et Serge Pin du Laboratoire de Radiolyse (CEA/Saclay/DSM/DRECAM). Les modes opératoires relatifs à cette partie sont décrits au chapitre V, partie VIII.

Afin de déterminer le mécanisme d'incorporation de deutérium au sein de la tyrosine, différentes séries d'expériences sont réalisées. Les conditions testées regroupent:

- un milieu totalement, partiellement ou pas du tout réducteur

- différents oxydants
- des pH couvrant toute la gamme

La réactivité vis-à-vis des radicaux hydroxyle d'analogues de la tyrosine sans phénol ou sans fonction amine a également été étudiée.

On étudiera la dégradation de la tyrosine, l'incorporation en deutérium et sa régiosélectivité en fonction des conditions de réaction.

II.1. Mise au point des conditions de mesure de la dégradation et de la régiosélectivité par RMN

II.1.1. Détermination de la dégradation par HPLC

La détermination de l'incorporation isotopique par spectrométrie de masse a déjà été décrite au chapitre III. Dans le même temps, nous avons décidé d'étudier la dégradation de la tyrosine en fonction de la dose ou des conditions expérimentales diverses. On s'attend à voir apparaître comme produits secondaires majoritaires de la dityrosine et de la 3,4-dihydroxyphénylalanine (3,4-DOPA). On va injecter successivement ces trois composés afin d'une part de connaître leur temps de rétention par ce système analytique et d'autre part de quantifier chacun des produits. Toutes les données chromatographiques sont regroupées dans la partie expérimentale, chapitre V, partie VIII.

La tyrosine et la 3,4-DOPA sont disponibles commercialement. En revanche la dityrosine doit être préparée au laboratoire. Plusieurs méthodes sont envisageables parmi toutes celles décrites dans la littérature, comme l'oxydation avec KBrO_3 ²⁹ ou l'association oxone/ Ni^{2+} ,³⁰ ces méthodes n'ayant pas abouti, nous nous sommes tournés vers l'irradiation de la tyrosine en tampon alcalin.³¹ Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas pu obtenir le témoin en quantité suffisante pour effectuer des mesures de rendement précises.

II.1.2. Mesure de l'incorporation isotopique par RMN ^1H et ^2H

L'intérêt de ces expériences est de déterminer les positions d'incorporation de deutérium lors de l'irradiation de tyrosine en présence de composés réducteurs. On irradie des solutions à 800 μM en acide aminé.

II.1.2.a. Méthodologie

La RMN nous permet d'analyser les différents produits obtenus après radiolyse de la

solution aqueuse de tyrosine (RMN ^1H), mais la détermination de l'incorporation n'est pas assez précise en raison de l'erreur élevée sur l'intégration, augmentée par l'effet de sels et la faible solubilité de la tyrosine. En plus les produits secondaires vont contaminer les pics de la tyrosine, ce qui va d'autant modifier les valeurs d'intégration. Ces spectres sont donnés en annexe. La RMN ^2H , elle, va nous donner les positions de deutération préférentielles sans aucune ambiguïté.

D'autre part, la mesure de spectres RMN ^1H en mode J-résolue (donnant la valeur des constantes de couplages en fonction du déplacement chimique) de solutions témoin Y-*d0* et Y-*d1* ne nous a pas permis de vérifier la formation des isotopomères deutérés de la tyrosine, comme ceci est possible avec le tritium.³² Cette méthode a donc été rejetée pour l'analyse qualitative des échantillons.

II.1.2.b. Mesure des spectres de RMN $^1\text{H}/^2\text{H}$ du témoin

Il nous a été possible d'effectuer la RMN du deutérium grâce à la collaboration avec Jacques Courtieu et Abdelkrim Meddour du Laboratoire de Chimie Structurale Organique, à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay.

La tyrosine-*d1* est dissoute dans une quantité adéquate d'une solution soit de NaOD/D₂O pD 13, soit de DCl pD 1, puis le spectre RMN ^1H est mesuré. Les deux spectres sont rigoureusement identiques.

En revanche, en RMN ^2H , dans NaOH ou HCl, les raies sont plus fines en milieu acide. De plus la purification de la tyrosine s'effectue en milieu acide; l'ajout de soude formera donc du chlorure de sodium provenant de l'HCl résiduel. On va ainsi augmenter la force ionique dans le tube, donc un élargissement des raies non souhaité. En conclusion, il est donc préférable d'effectuer la RMN ^2H en milieu acide.

II.2. Etude en milieu partiellement et totalement réducteur

En premier lieu, on étudie le comportement de la tyrosine en milieu réducteur (e^-_{aq} majoritairement) pour corrélérer avec les expériences de photochimie. Dans les deux séries d'expériences suivantes, on autorise la réaction de l'électron aqueux avec la tyrosine par bullage à l'argon qui permet de désaérer les solutions.

La première série d'étude permet, par ajout de formiate de sodium, d'éliminer la contribution des radicaux hydroxyle, donc de regarder l'action de l'électron aqueux sur la tyrosine en milieu deutéré.

La deuxième série d'expériences regarde l'influence conjointe de l'attaque des radicaux hydroxyle et des électrons aqueux sur la dégradation de la tyrosine ainsi que sur l'incorporation en deutérium.

II.2.1. Suppression totale des radicaux hydroxyle

On ajoute à la solution de tyrosine du formiate de sodium 100 mM. Ainsi, on capture les radicaux hydroxyle en formant un radical lui aussi réducteur $\text{CO}_2^{\bullet-}$ ($E^\circ = -1,9\text{V}$ à pH 7).^{33,34}

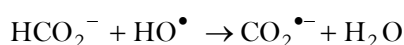


Schéma IV-15 : formation du radical $\text{CO}_2^{\bullet-}$

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau IV-4. L'entrée 1 correspond à l'électron aqueux seul, en comparaison avec le radical hydroxyle seul (entrée 2). La capture de l'électron aqueux s'effectue par bullage au protoxyde d'azote N_2O qui le convertit en radical hydroxyle (doublement de $[\text{HO}^\bullet]$).

Entrée	Dose	$[e_{aq}^-]_f$	$[\text{HO}^\bullet]_c$	%Y	Inc. (%)	o/m
1	3 040 Gy	885 μM	-	68%	5,1% \pm 0,1%	0,8
2	1 520 Gy	-	885 μM	61%	4,6% \pm 0,6%	nd

Tableau IV-4 : irradiation de Y en présence de formiate de sodium ; $[\text{Y}] = 100$, $[\text{Pi}] = 10 \text{ mM}$, $\text{pD} = 7,2$, bullage Ar

Il n'a pas beaucoup de différence entre les deux taux d'incorporation. Le chromatogramme obtenu ne montre pas de dégradation (Figure IV-2).

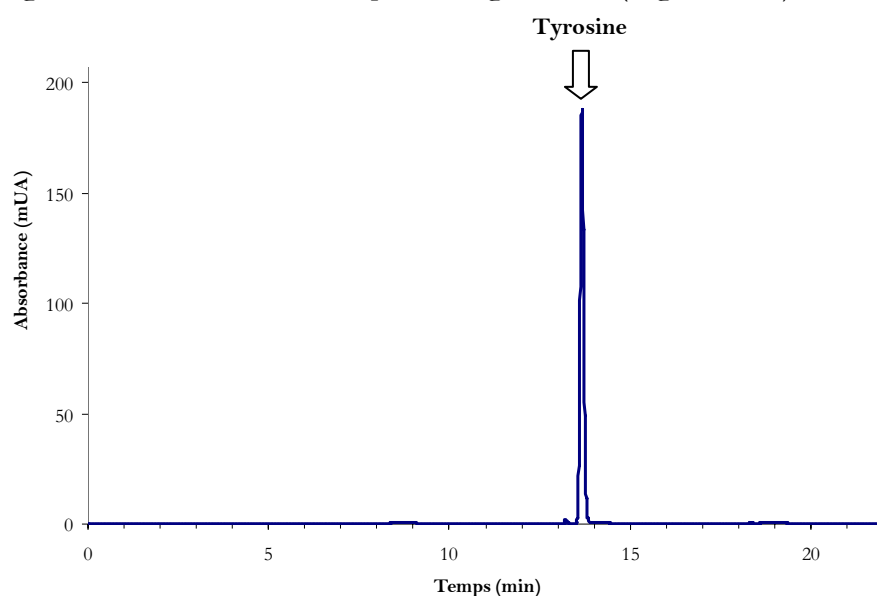


Figure IV-2 : Chromatogramme de la tyrosine irradiée en présence de formiate 100 mM ; $[\text{Y}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{HO}^\bullet]_c = 230 \mu\text{M}$, $[\text{Pi}] = 10 \text{ mM}$, $\text{p}^2\text{H} = 7,2$, bullage Ar

Le spectre RMN ^2H montre beaucoup de contamination malgré plusieurs purifications successives et un spectre RMN ^1H conforme à la tyrosine. Il y a dans ce cas *a priori* du marquage sur toutes les positions (cf. annexe).

L'effet obtenu ici est beaucoup moins flagrant que celui obtenu par London et Gabel,²¹ que ce soit au niveau du ratio entre *ortho* et *méta* ou au niveau du taux d'incorporation lui-même pour la même dose déposée. Il est possible que l'efficacité de l'électron aqueux soit enrayée par la présence de formiate.

Ces expériences ont été réalisées avec du formiate de sodium non deutéré. L'emploi de formiate de sodium deutéré ne modifie pas l'incorporation.^{†††}

II.2.2. Etude de l'action conjointe du radical hydroxyle et de l'électron aqueux

Les conditions opératoires et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau IV-5. Les échantillons perçoivent la même dose pour les entrées 1 et 2 (3040 Gy). A dose égale, on observe conjointement une augmentation de l'incorporation en deutérium et de la quantité de tyrosine récupérée dans l'échantillon comprenant à la fois électron aqueux et radical hydroxyle, par rapport au radical hydroxyle seul. L'entrée 3 représente une dose moitié, où $[\text{e}_{\text{aq}}^-]_1 = [\text{HO}^\bullet]_3$. Le même comportement est observé.

Entrée	Dose	$[\text{e}_{\text{aq}}^-]_f$	$[\text{HO}^\bullet]_c$	%Y	Inc. (%)	o/m
1	3 040 Gy	885 μM	885 μM	71% \pm 5%	19,1% \pm 0,3%	1,5
2	3 040 Gy	-	1770 μM	45%	10,1% \pm 0,2%	2,9
3	1 520 Gy	-	885 μM	61%	4,6% \pm 0,6%	nd

Tableau IV-5 : Irradiation de Y sous flux d'argon ; [Y]=800 μM , [Pi]=10 mM, pD=7,2, bullage Ar

Cette voie montre un fort enrichissement de la tyrosine. De plus, le chromatogramme de la tyrosine irradiée sous argon ne révèle aucun produit secondaire en quantité significative. Il est analogue à celui de la Figure IV-2.

L'étude RMN ^2H (Figure IV-3) montre une augmentation du ratio o/m par rapport à l'électron aqueux seul, en revanche on augmente *via* l'électron aqueux l'incorporation en *méta*. Ces résultats vont dans la direction de ceux obtenus par Gabel *et coll.* sur la photochimie de la tyrosine en milieu deutéré, montrant aussi peu de dégradation.²¹

^{†††} Dans des conditions légèrement différentes, l'irradiation de la tyrosine avec le formiate deutéré conduit à une incorporation de 2,8% au lieu de 2,0% avec NaHCO_2 .

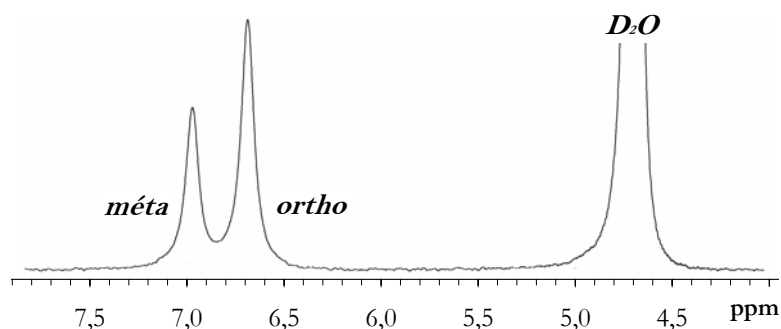


Figure IV-3 : spectre RMN ^2H dans D_2O de la tyrosine irradiée en présence de HO^\bullet et e_{aq}^-

Cette méthode est moins efficace pour enrichir la tyrosine que celle exposée par Gabel, mais on pourrait augmenter la quantité d'électrons aqueux formés, plus petite dans nos expériences, afin de regarder l'effet sur l'incorporation. On voit aussi que la méthode au formiate présente une incorporation plus faible, certainement due au fait que le mécanisme impliqué diffère de celui de l'électron aqueux et doit certainement rentrer en compétition avec lui.

II.3. Etude en milieu oxydant

Dans les expériences suivantes, l'utilisation du protoxyde d'azote à la place de l'argon permet, lors de la radiolyse de l'eau, de convertir les électrons aqueux formés en HO^\bullet , donc de doubler la concentration en radicaux hydroxyle formés.

II.3.1. Etude en fonction de la concentration en HO^\bullet

Les études suivantes ont été effectuées en milieu non tamponné et tamponné (100 mM en tampon phosphate pD 7,2). On regarde l'influence de la dose, soit de la concentration en radical hydroxyle, sur le taux (Inc (%)) et la régiosélectivité (ratio *ortho*/*méta*) de l'incorporation isotopique ainsi que sur la dégradation (%Y représente la tyrosine recouvrée après irradiation).

II.3.1.a. Etude de l'incorporation isotopique (SM) et de la dégradation

La Figure IV-4 représente le niveau d'incorporation au sein de la tyrosine avec ou sans tampon (axe de gauche), ainsi que le pourcentage de tyrosine retrouvée après irradiation pour les deux conditions de tampon (axe de droite). Les pourcentages indiqués correspondent au pourcentage de tyrosine recouvrée à la fin de l'irradiation.

Dans la série d'expériences sans tampon (courbes roses), on montre donc que la

tyrosine dans l'eau lourde est capable de s'auto-réparer. On imagine que la réparation puisse procéder via les fonctions phénol et/ou amine de la tyrosine, de manière inter- ou intramoléculaire.

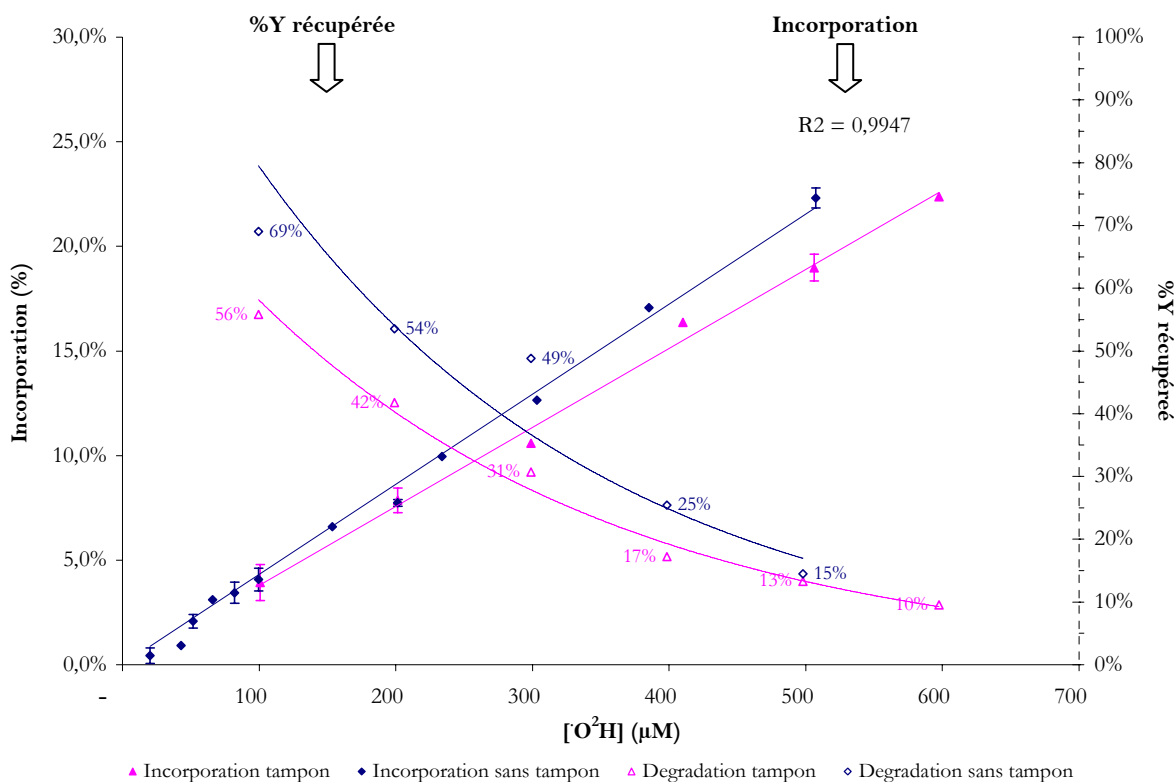


Figure IV-4 : Evolution du marquage de la tyrosine en fonction de $[HO^{\bullet}]$. Droites pleines, incorporation ; droites en pointillés, %Y récupérée.

L'incorporation observée est proportionnelle à la concentration en HO^{\bullet} quelle que soit la dose utilisée, même dans les domaines de forte dégradation. Les courbes de dégradation, elles, suivent des exponentielles décroissantes

Lorsque la solution est tamponnée (courbes bleues), on observe une légère diminution de la quantité de deutérium incorporée dans la tyrosine sans voir une différence nette de la dégradation. La différence d'incorporation provient certainement du fait que le tampon absorbe une partie des radicaux hydroxyle, qui ne sont plus aptes à réagir avec la tyrosine. Il y a donc moins de radicaux formés sur la tyrosine et donc moins de phénomène de réparation.

D'autre part, on pourrait penser que la diminution des radicaux hydroxyle, induite par la réaction des radicaux avec le tampon, pouvant réagir avec la tyrosine conférerait un effet de protection de la tyrosine; les résultats montrent cependant que le tampon n'induit pas un phénomène de protection, mais pourrait réagir sous forme radicalaire avec la tyrosine, conduisant à sa dégradation accrue.

La Figure IV-5 représente le chromatogramme de la tyrosine irradiée dans l'eau lourde

(ratio $[^2\text{HO}^\bullet]/[\text{Y}]=2,3$). Celui-ci corrobore la faible dégradation affichée par la tyrosine dans les conditions de réaction.

Le pic à $t_R=15,8$ min a été attribué à de la 3,4-DOPA par comparaison des profils d'élution HPLC et par spectrométrie de masse. L'analyse par RMN ^1H du produit purifié a également confirmé qu'il s'agissait de 3,4-DOPA. On estime à 16% le pourcentage de DOPA formée lors de cette expérience. De manière surprenante, aucune trace de dityrosine n'a été détectée par spectrométrie de masse, alors que d'après la littérature, c'est le produit majoritaire qui se forme en milieu désaéré par recombinaison du radical phénoxy. L'explication qui semble la plus raisonnable, renforcée par l'étude de la dégradation en fonction de la concentration en $[\text{HO}^\bullet]$, est qu'à de faibles doses, le mécanisme de régénération en compétition avec celui de dégradation est majoritaire. Plus la concentration en radicaux hydroxyle augmente, plus le mécanisme d'autoréparation devient défavorable, au profit de la dégradation ; les données de la littérature montrent que l'on observe de la dityrosine à plus hautes doses. Nous n'avons pas pu isoler les dimères par HPLC qui semblent être instables sous ces conditions.⁴⁴

D'autres produits de type polymériques sont formés lors de ces expériences non détectables par HPLC.

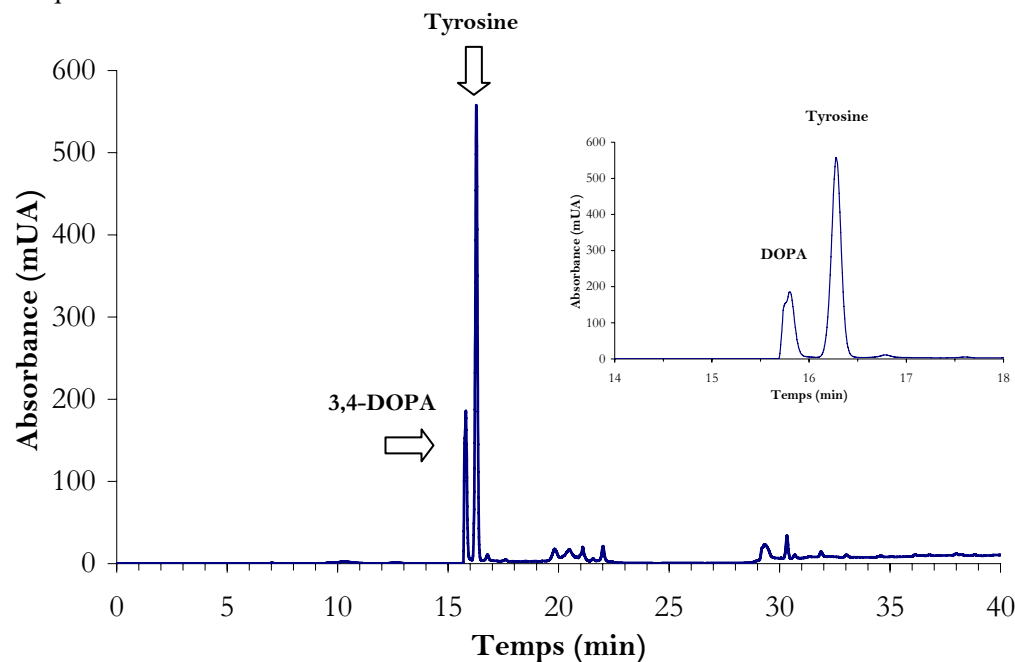


Figure IV-5 : Chromatogramme d'une solution de Y irradiée. $[\text{Y}]=800\ \mu\text{M}$, $[^2\text{HO}^\bullet]=1,77\ \text{mM}$, $[\text{Pi}]=100\ \text{mM}$, $\text{pD}=7,2$, bullage N_2O

II.3.1.b. Etude de la régiosélectivité de l'incorporation (RMN ^2H)

Pour ces expériences, on augmente à la fois les concentrations en tyrosine et en

radicaux hydroxyle, pour obtenir suffisamment de matériel pour réaliser l'analyse par RMN ^2H . On se place dans des conditions où l'incorporation est assez forte, pour que l'on puisse observer un signal en RMN ^2H (Tableau IV-6).

Entrée	$[Pi]$	%Y	Inc. (%)	<i>o/m</i>	β
1	0 mM	41%	$7,8\% \pm 0,4\%$	3,1	$0,2 \times I_{\text{méta}}$
2	100 mM (pD=7,2)	51%	$6,9\% \pm 0,2\%$	2,9	Pas de signal

Tableau IV-6 : Irradiation de Y, $[Y]=800 \mu\text{M}$, $[^2\text{HO}^*]=1,77 \text{ mM}$, bullage N_2O

Le spectre de RMN du deutérium (Figure IV-6, B,) montre que la position *ortho* est le site d'incorporation préférentiel par rapport à la position *méta*. Le ratio est de 3, ce qui reflète la tendance observée par les densités de spin (densité en *méta* égale à 20% de celle en *ortho*), même si le ratio calculé par RMN est plus faible. On observe un faible signal sur le méthylène de l'échantillon irradié sans tampon (égal à 0,2 fois l'intensité du signal *méta*).

Cela, sans toutefois l'éliminer, indique que le passage par un intermédiaire pseudo-quinone est un phénomène plus que minoritaire.²³

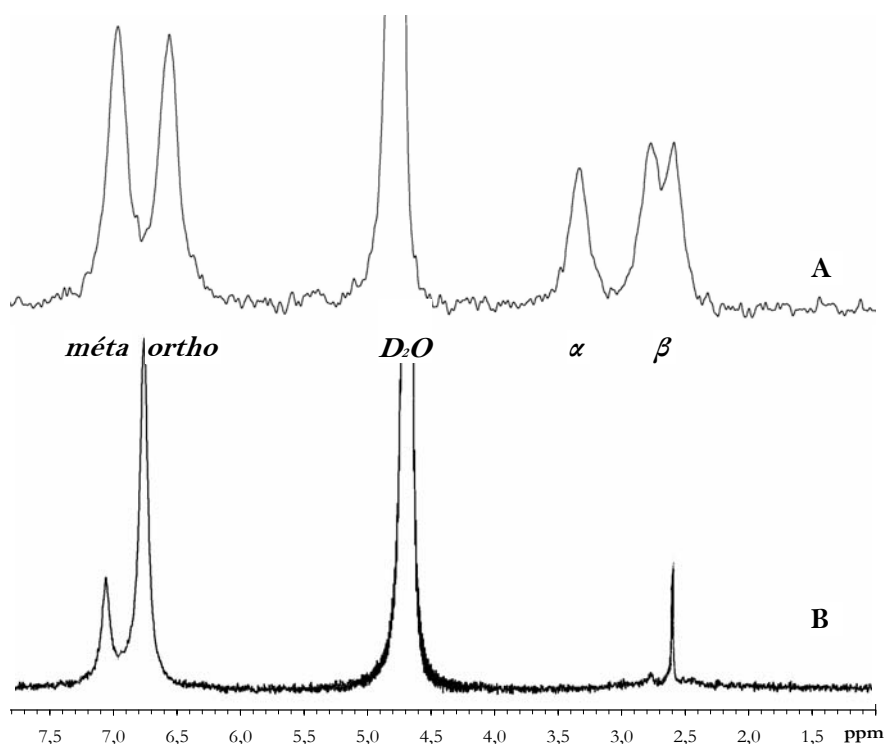


Figure IV-6 : A : spectre RMN ^2H de la tyrosine- d_5 . B : spectre RMN ^2H de la Y irradiée dans D_2O

Par la suite nous nous focaliserons surtout sur le taux de dégradation et la régénération (via l'incorporation isotopique) de la tyrosine.

II.3.2. Etude en fonction du pH

On fait varier le pH des solutions irradiées entre 3 et 13 afin d'étudier le comportement de la tyrosine irradiée en fonction de ces différents états de protonation. On rappelle que les pK_a de la tyrosine sont 2,2 (acide carboxylique), 9,1 (amine), 10,1 (phénol). La variation du rapport o/m en fonction du pH est représentée sur la Figure IV-7 ainsi que l'incorporation.

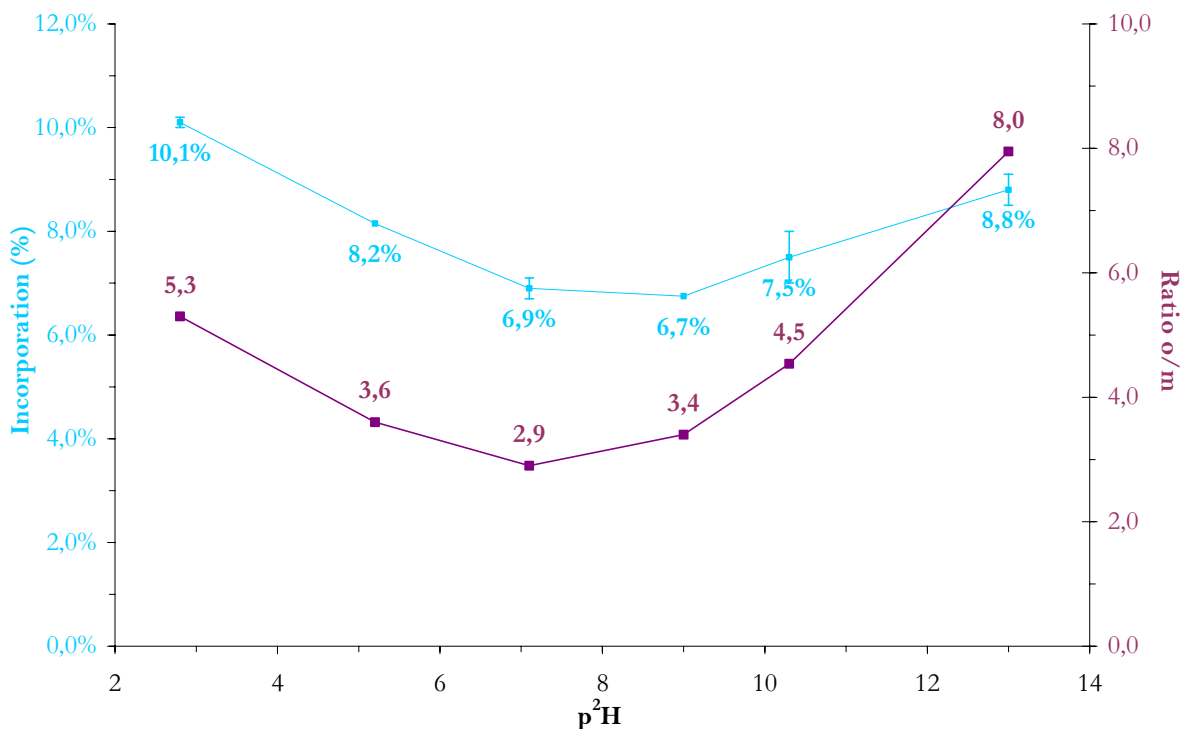


Figure IV-7 : Evolution du marquage de la tyrosine en fonction du p^2H

Les résultats de mesure de la dégradation sont regroupés dans le Tableau IV-7.

Entrée	pD	%Y
1	2,8	26%
2	5,2	40%
3	7,1	51%
4	9,0	58%
5	10,3	44%
6	13,0	42%

Tableau IV-7 : Irradiation pD -dépendantes de Y; $[Y]=800 \mu M$, $[^2HO^{\bullet}]=1,77 \text{ mM}$, $[Pi]=100 \text{ mM}$, bullage N_2O

L'échange $^1H/^2H$ montre une dépendance au pH relativement marquée. La tyrosine incorpore du deutérium quel que soit le p^2H . Aucun signal en RMN 2H n'est observé sur le méthylène à part à p^2H 3.

La Figure IV-8 représente les signaux de RMN ^2H obtenus à pH 3, 5, 11 et 13. Les données de la littérature indique que la vitesse de réaction entre la tyrosine et les radicaux HO^\bullet est semblable quel que soit le pH, acide,^{35,36} neutre¹ ou basique.³⁶ La différence d'incorporation ne proviendrait donc pas d'une différence de réactivité intrinsèque, liée à la vitesse, mais bien de passage par des mécanismes de deutération distincts.

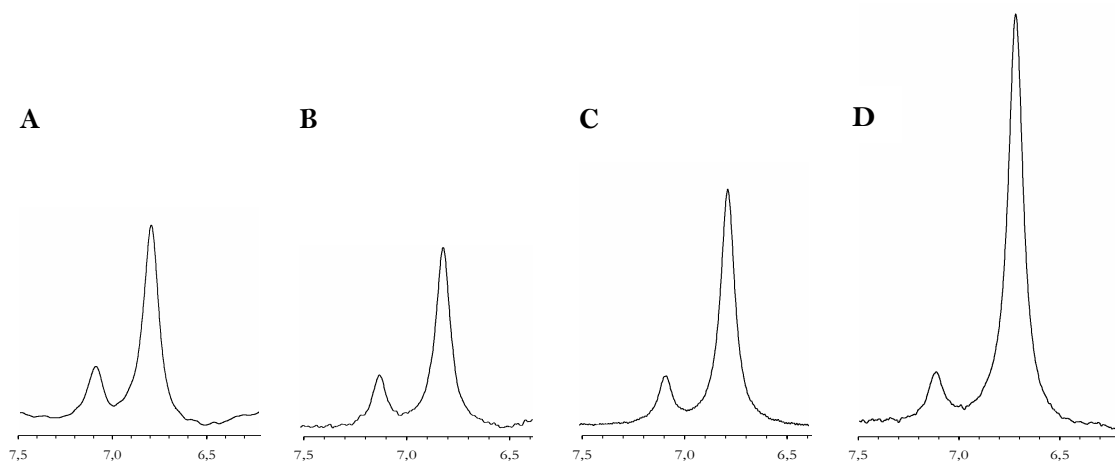


Figure IV-8 : spectres RMN ^2H de la tyrosine irradiée à différents p ^2H . A : p ^2H 3 ; B : p ^2H 5 ; C : p ^2H 11 ; D : p ^2H 13.

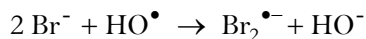
A bas p ^2H , on peut avoir échange isotopique acido-catalysé, expliquant à la fois la plus grande incorporation et la préférence pour la position *ortho*. On observe de plus une forte dégradation en DOPA. On n'a plus de capture efficace des électrons aqueux par le protoxyde d'azote, d'où une plus grande concentration en $^2\text{H}^\bullet$, avec formation d'adduits différents. Notamment, l'addition de $^2\text{H}^\bullet$ sur les adduits hydroxylés conduit à la DOPA.

En revanche à haut p ^2H , l'incorporation croît avec une forte augmentation du ratio o/m. Cela vient du fait que l'espèce majoritaire est $\text{O}^{\bullet-}$ ($\text{pK}_a \text{HO}^\bullet/\text{O}^{\bullet-} = 11,9$),²⁶ qui, au contraire du radical hydroxyle électrophile, préfère oxyder que s'additionner sur le cycle. La conséquence de cela est que l'on va former plus de radical tyrosyle, donc privilégier la position *ortho*. En revanche, dans ce cas, il ne devrait pas y avoir *a priori* d'échange lié à une catalyse basique (cf. I.2.4, p. 151).

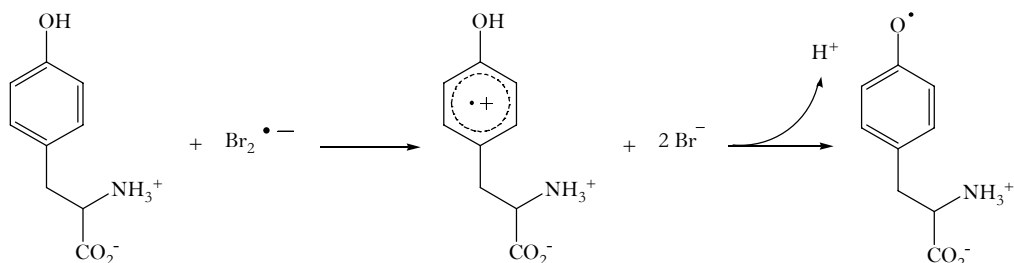
II.3.3. Formation du radical phénoxyle

Par ce biais, on cherche à étudier l'oxydation de la tyrosine en s'affranchissant de la réaction préférentielle des radicaux HO^\bullet par addition sur le cycle. Cette réaction forme uniquement le radical phénoxyle comme intermédiaire.

L'irradiation de solutions aqueuses de KBr saturées en N_2O , produit le radical anion dibromure $\text{Br}_2^{\bullet-}$ avec un rendement de $0,7 \mu\text{mol} \cdot \text{J}^{-1}$ en moins de $0,5 \mu\text{s}$ (Schéma IV-16).³⁷

Schéma IV-16 : formation du radical $\text{Br}_2^{\bullet-}$

Cette espèce très oxydante réagit avec la tyrosine pour former le radical cation; par perte de proton, on obtient le radical tyrosyle (Schéma IV-17).

Schéma IV-17 : formation du radical tyrosyle *via* les radicaux $\text{Br}_2^{\bullet-}$

Avec (entrée 1, Tableau IV-8) et sans KBr (entrée 2), le taux et la régiosélectivité de l'incorporation est identique. De plus, il n'y a pas de deutération sur la chaîne latérale.

Entrée	$[\text{Br}_2^{\bullet-}]_e$	$[\text{HO}^\bullet]$	%Y	Inc. (%)	<i>o/m</i>
1	1,77 mM	-	44%	7,1% \pm 0,1%	3,1
2	-	1,77 mM	51%	6,9% \pm 0,2%	2,9

Tableau IV-8 : irradiation de Y en présence de KBr ; [Y]=800 μM , [Br]=100 mM, [Pi]=10 mM, pD=7,2, bullage N_2O

Ces résultats montrent que l'incorporation de deutérium dans la tyrosine irradiée est **liée à la formation transitoire du radical phénoxyle**. En d'autres termes, l'incorporation de deutérium a lieu après formation du radical tyrosyle lors de la réaction avec les radicaux hydroxyle. En revanche, on constate beaucoup de perte de tyrosine initiale. Le chromatogramme correspondant (Figure IV-9) à la solution brute en présence de KBr ne montre pas beaucoup de produits de dégradation, notamment pas d'adduit hydroxylé (piégeage de HO^\bullet efficace).

En revanche, des produits de polymérisation non analysables par HPLC peuvent être présents, ce qui peut diminuer de manière conséquente la teneur en tyrosine recouvrée. Aucune présence de dityrosine n'est détectée lors de l'analyse en masse et par RMN ^1H du brut.

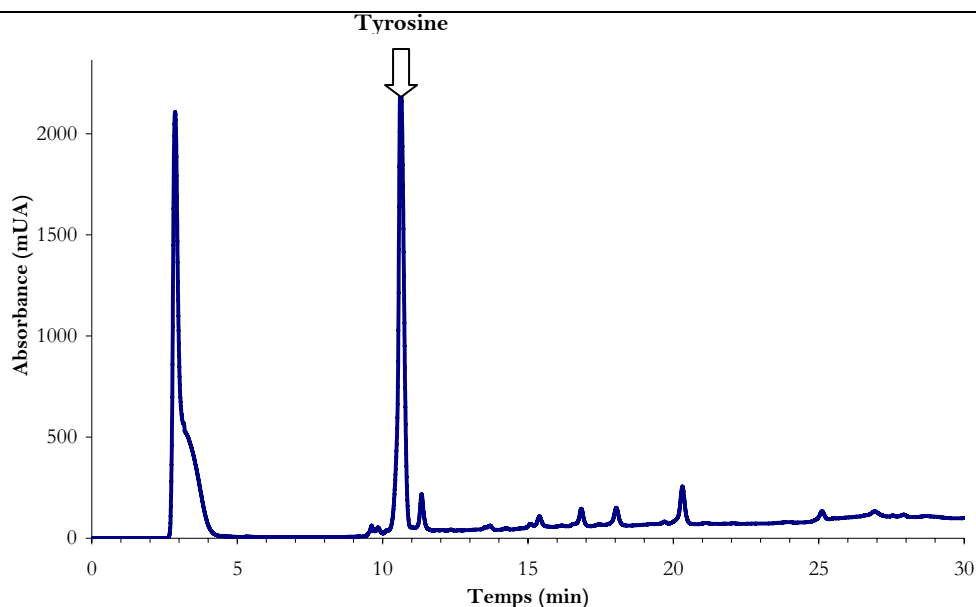


Figure IV-9 : Chromatogramme d'une solution de Y irradiée en présence de KBr

II.4. Etude d'analogues de la tyrosine

Afin de déterminer quelle est la fonction responsable de l'autoréparation de la tyrosine, nous avons étudié l'effet de la radiolyse sur trois substrats analogues de la tyrosine (Figure IV-1, p.145).

II.4.1. Dépendance à la dose des analogues

A l'instar de l'étude effectuée sur la tyrosine, la courbe donnant le pourcentage d'incorporation en deutérium en fonction de la concentration en radicaux hydroxyle sur les trois analogues est réalisée (dans l'eau lourde seule), Figure IV-10.

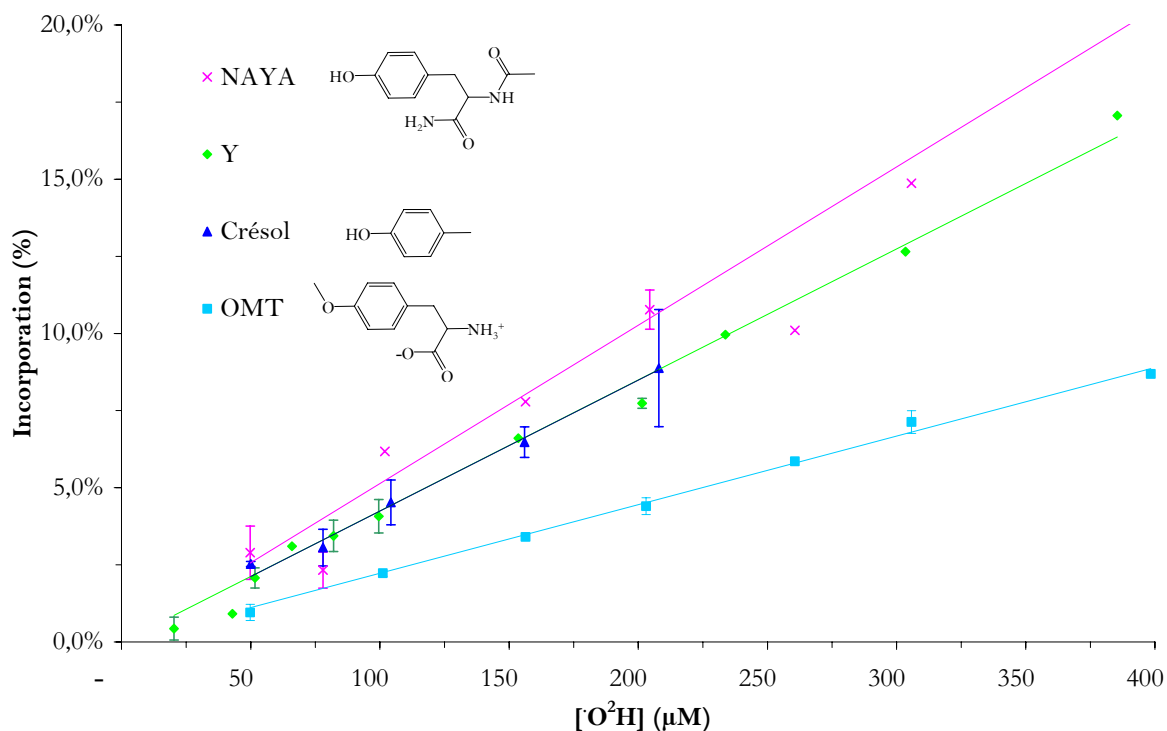


Figure IV-10 : Evolution du marquage des analogues de la tyrosine en fonction de $[\text{O}^2\text{H}]$

De même que pour la tyrosine, l'incorporation est linéaire en fonction de la concentration en $^2\text{HO}^\bullet$ pour chacun des analogues.

La Figure IV-11 représente le pourcentage de substrat récupéré après irradiation en fonction de la dose (calculé par HPLC du brut, moyenne de trois expériences).

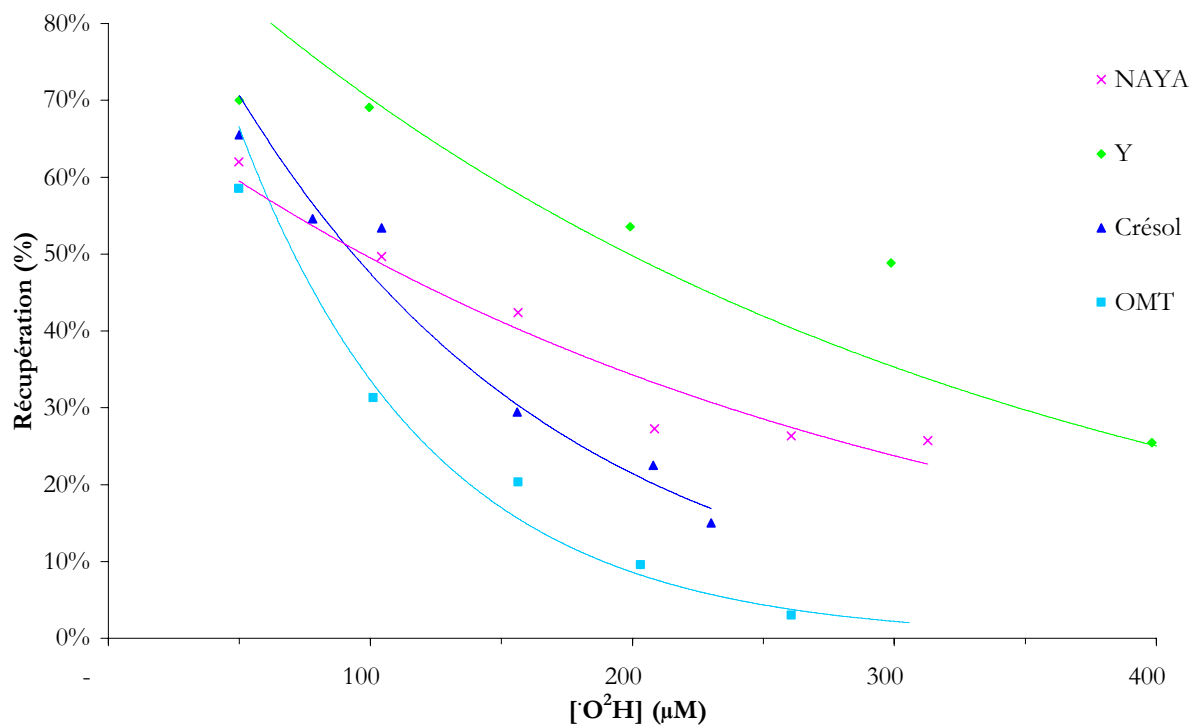


Figure IV-11 : Evolution de la dégradation des analogues de la tyrosine en fonction de $[\text{O}^2\text{H}]$

La tyrosine est de loin la molécule qui se dégrade le moins. La dégradation pour les

trois molécules est plus conséquente que pour la tyrosine (plus explicitée dans l'étude individuelle), c'est pourquoi l'étude est réalisée à des doses plus faibles.

Pour illustrer cette dégradation, les chromatogrammes des quatre molécules sont représentés sur la Figure IV-12. Les flèches représentent le pic de la molécule initialement irradiée.

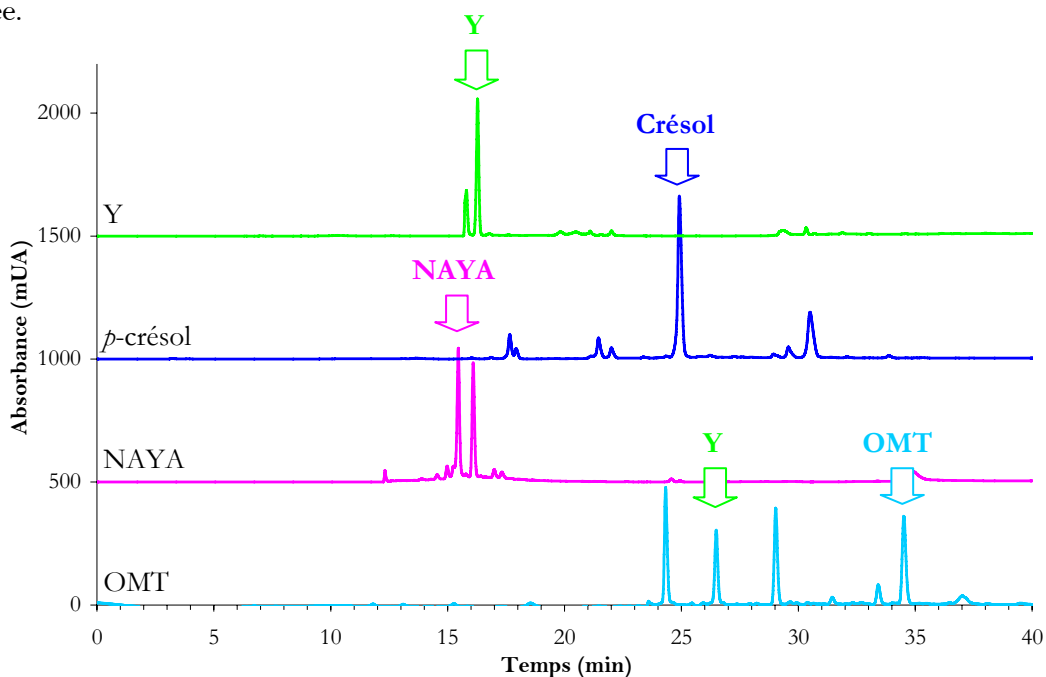


Figure IV-12 : Chromatogrammes de la tyrosine et d'analogues irradiés. [Substrat]=800 μ M, $[^2\text{HO}^\bullet]=1,77$ mM sauf pour *p*-crésol $[^2\text{HO}^\bullet]=0,89$ mM, $[\text{Pi}]=10$ mM, $\text{pD}=7,2$, bullage N_2O

Pour la O-méthyle tyrosine, la RMN et la spectrométrie de masse montre, en plus de O-méthyl-3-hydroxyphénylalanine, la présence de tyrosine comme produit de radiolyse (flèche verte).

Le produit secondaire isolé lors de la radiolyse du *N*-acétyl tyrosinamide se révèle être le dimère (analysé par RMN ^1H et spectrométrie de masse). Il semble donc que la tyrosine, sous cette forme plus proche de celle sous laquelle on la trouve dans les protéines, a une plus grande tendance à se dimériser.

Les résonances observées sur le spectre RMN de la solution irradiée de crésol montre *a priori* les quatre produits de dégradation du crésol, qui sont le 4-méthyl-catéchol (produit de dégradation majoritaire), 4-méthyl-résorcinol, l'alcool *p*-hydroxybenzylique et la *p*-diènone.^{3,4} En revanche ces produits répondent mal en ESI-MS et n'ont donc pu être analysés par cette technique.

II.4.2. Influence du phénol : étude de la tyrosine O-méthylée

II.4.2.a. Etude de la dégradation et de l'incorporation

Sur la Figure IV-10 (p. 166) il apparaît que la tyrosine O-méthylée a, de manière surprenante, incorporé du deutérium, ceci à une teneur plus faible que la tyrosine. On s'attendait à ce qu'elle soit proche de zéro en considérant la fonction phénol comme étant le vecteur de l'atome de deutérium. Ce phénomène n'est pourtant pas si surprenant au regard du fait que la tyrosine est un produit de dégradation et qu'elle pourrait être capable de l'introduction de deutérium dans OMT. Ceci est analogue à la formation de phénol lors de l'attaque par des radicaux hydroxyle de l'anisole (méthoxybenzène).³⁸ Le Schéma IV-18 adapté de Li *et al.* montre la formation de tyrosine lors de l'irradiation d'une solution dégazée par N₂O d'OMT.

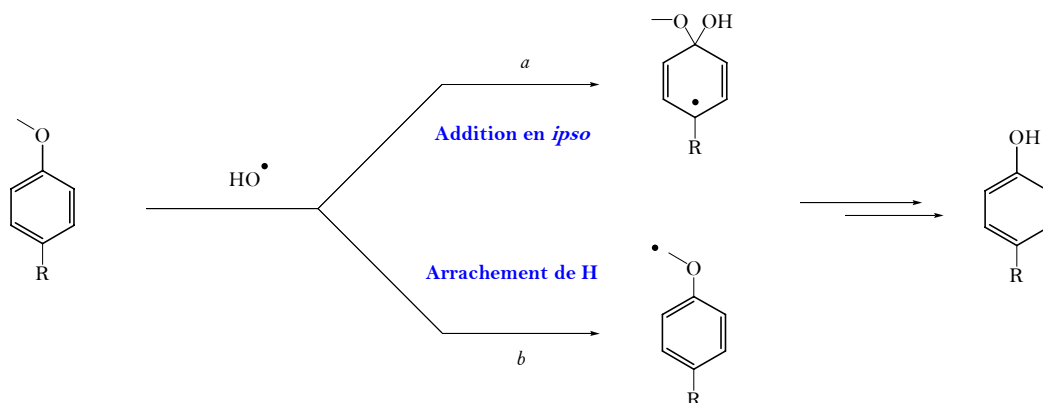


Schéma IV-18 : schéma proposé de la formation de tyrosine lors de la réaction entre HO• et OMT

Deux mécanismes sont impliqués : il y a soit addition du radical hydroxyle en position *ipso* du phénol (voie a), suivie de la perte d'une molécule de méthanol (formation du radical phénoxy), soit arrachement d'un hydrogène du groupement méthoxy (voie b). Après réarrangement, le phénol est obtenu.³⁹

Ce mécanisme repose, pour la voie a, sur la distribution de la densité de spin, notamment sur le carbone *ipso*. Celle-ci diffère entre Tyr et OMT : elle est environ quatre fois supérieure pour le carbone *ipso* d'OMT (C1) par rapport à la tyrosine.¹¹ Cela explique donc que la position *ipso*, riche en électron, est, dans ce cas, un site préférentiel d'attaque du radical hydroxyle. Or, la formation d'un adduit hydroxylé sur cette position conduit majoritairement à la perte d'une molécule de méthanol, avec la formation concomitante de tyrosine. Quand la fonction méthoxy et un groupement donneur sont en position *para* sur le cycle, comme c'est le cas pour OMT, il y a environ 22% de méthanol produit.⁴⁰

Pour la voie b, la déméthylation du groupement méthoxy s'explique par la force de

liaison entre l'oxygène et le groupement méthyle, qui est relativement faible, de l'ordre de 62 kcal.mol⁻¹.⁴¹

En bloquant la position phénol nous voulions montrer que la réparation était due à cette fonction. C'est pourquoi, en parallèle, nous avons étudié l'effet de l'ajout de tyrosine dans une solution de OMT et comparé avec la OMT irradiée seule. Les conditions opératoires pour l'irradiation et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau IV-9. Les entrées 1 et 2 correspondent à la tyrosine O-méthylée (OMT) irradiée sans tyrosine (1) et avec tyrosine (2), l'entrée 3 correspond à la tyrosine irradiée sans OMT (solution témoin).

Entrée	Composé	[² HO [•]]	%AA	Inc. (%)
1	OMT	230 μM	23%	5,4% ± 0,3%
2	OMT (+Y)	460 μM	8%	7,3% ± 0,2%
3	Y	230 μM	47%	8,4% ± 0,1%

Tableau IV-9: irradiation de tyrosine O-méthylée en présence ou non de Y; [Y]=[OMT]=100 μM, [Pi]=10 mM, p²H=7,2, bullage N₂O

Les mêmes résultats dans les conditions du Tableau IV-9 sont obtenus en irradiant une solution de tyrosine O-méthylée sans tampon (*Inc* = 5,3% ± 0,6%), éliminant ainsi tout phénomène de réparation par le tampon.

En présence de tyrosine, l'incorporation dans OMT augmente. Il est clair que la fonction phénol est impliquée dans le phénomène de réparation. De plus, le pourcentage de O-méthyl tyrosine chute de manière drastique quand cette dernière est irradiée avec la tyrosine. Il est difficile d'expliquer ce phénomène en l'absence de données concernant les vitesses de réaction de l'arrachage d'un hydrogène du méthyle, qui pourrait expliquer cette différence. Celle-ci ne provient pas d'un écart de réactivité au niveau du cycle aromatique. Les vitesses de réaction d'addition du radical hydroxyle sur l'anisole sont, en effet, du même ordre de grandeur que pour la tyrosine ($5,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).⁴²

II.4.2.b. Etude de la régiosélectivité

Le ratio $\frac{I_{ortho}}{I_{méta}}$ est dans le cas de OMT est plus faible que pour la tyrosine (Tableau

IV-10, entrée 1). L'entrée 2 correspond aux résultats obtenus sur la tyrosine irradiée seule dans les mêmes conditions. On n'observe pas d'incorporation sur le groupement méthyle, mais par contre du deutérium est présent sur la position méthylène en faible proportion.

Entrée	AA	%AA	Inc. (%)	o/m	β
1	OMT	25%	4,9% \pm 0,1%	2,0	0,2 I _{méta}
2	Y	51%	6,9% \pm 0,1%	2,9	Pas de signal

Tableau IV-10 : irradiation de la tyrosine O-méthylée ; [Y]=[OMT]=800 μ M, [H₂O[•]]=1,77 mM, [Pi]=10 mM, p²H=7,2, bullage N₂O

La Figure IV-13 représente le spectre de RMN ²H correspondant à OMT irradiée. D'après les densités de spin calculées dans la littérature sur le radical issu du 4-méthyl-anisole, la position *méta* est la plus riche en électron non apparié, le ratio *ortho*/*méta* devrait s'échanger par rapport à celui observé pour la tyrosine. On voit ici une diminution claire du ratio, mais il n'est pas de un pour trois.

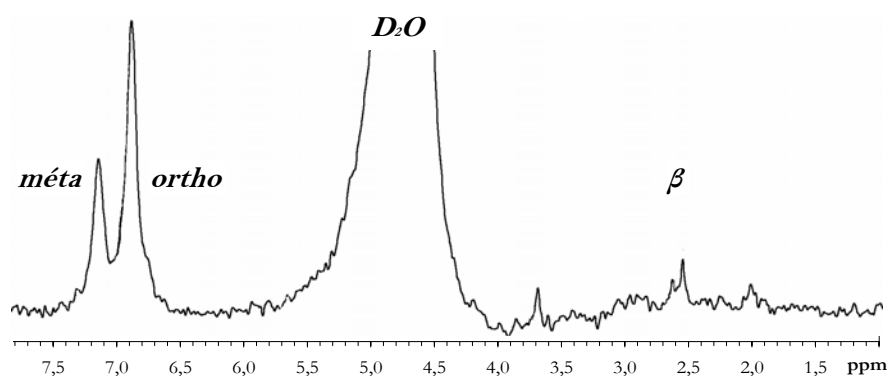


Figure IV-13 : spectre RMN ²H de la O-méthyle tyrosine irradiée dans D₂O

Le fait que le ratio *ortho*/*méta* ne soit pas plus faible peut provenir du fait que l'incorporation est plus faible, on enrichit donc moins en deutérium (comme ce que l'on peut voir en milieu réducteur, cf. II.2). La deuxième explication est que la partie acide aminé peut représenter une gêne stérique lors du phénomène du réparation, diminuant l'accessibilité de la position *méta* à l'agent réparateur.

Il y a minoritairement passage par un intermédiaire pseudo quinone, expliquant l'incorporation en deutérium sur la chaîne latérale. La faible résonance à 3,7 ppm peut être attribuée au méthoxy. Cependant, l'intégration est quasiment nulle, ce qui confirme que lorsqu'il y a formation du radical Ph-OCH₂[•], due certainement à l'arrachement d'un hydrogène par HO[•] sur le méthyle. Le produit majoritaire obtenu est le phénol Ph-OH par déméthylation. Le processus d'arrachage de l'hydrogène sur le méthyle et piégeage du radical ainsi produit par un atome de deutérium (échange ¹H/²H sur le méthoxy) est donc quasiment inexistant.

II.4.3. Influence de l'amine : étude du *p*-crésol

II.4.3.a. Etude de la dégradation et de l'incorporation

La comparaison du comportement entre crésol et tyrosine vis-à-vis de la radiolyse nous permet d'entrevoir le rôle de la fonction amine.

Le *p*-crésol est très sensible à la radiolyse, comme cela a été montré lors de la partie bibliographique, formant quatre produits d'oxydation connus. Pour les mêmes doses déposées que lors de la radiolyse de la tyrosine, la dégradation est tellement forte qu'il est quasiment impossible d'analyser le *p*-crésol. Cette constatation est corroborée par les résultats de la Figure IV-11 (p.166).

La Figure IV-10 (p. 166) nous permet de constater que tyrosine et crésol démontrent un comportement strictement identique vis-à-vis de l'incorporation à des concentrations en radical hydroxyle plus faibles. Ces résultats nous permettent de conclure que l'incorporation de deutérium est due à la fonction phénol. La partie acide aminé n'intervient donc pas dans le processus d'incorporation de deutérium.

II.4.3.b. Etude de l'incorporation à pH basique

On étudie l'incorporation à pH 13, de telle sorte que le crésol soit déprotoné ($pK_a=10,3$), avec soit de la soude seule, soit avec du tampon phosphate. A ce pH, le phénomène majoritaire est l'oxydation à un électron par $O^{\bullet-}$ (Tableau IV-11).

Entrée	Composé	%AA	Inc. (%)
1	p ² H 7	53%	4,5% ± 0,7%
2	Tampon Pi p ² H=13,2	41%	2,9% ± 0,5%
3	NaOD p ² H=13,2	32%	4,0% ± 0,5%

Tableau IV-11 : irradiation du *p*-crésol ; [Cr]=100 µM, [²HO[•]]=100 µM, [Pi]=100 mM, bullage N₂O

Comme pour la tyrosine, on retrouve du marquage bien que le crésol soit majoritairement sous forme phénolate. Dans ce cas, la réparation procède par un autre mécanisme.

Comme les produits de radiolyse du crésol sont bien connus, on peut proposer que ce soit un de ces biphénols (4-méthyl catéchol, 4-méthyl résorcinol, Alcool *p*-hydroxybenzylique)^{3,4} qui puisse régénérer le crésol. En effet, pour ces molécules, on observe que la valeur du deuxième pK_a est plus grand que celui du crésol (Tableau IV-12). La valeur

du pK_a pour QH_2/QH^- (Q représentant un produit de dégradation du crésol) est aux alentours de 9,7.⁴³

	$pK_a(QH/Q^-)$
4-méthyl-catéchol (<i>ortho</i>)	12,5
4-méthyl-résorcinol (<i>méta</i>)	11,3
Alcool <i>p</i> -hydroxybenzylique	15,4

Tableau IV-12 : valeur du deuxième pK_a des produits d'irradiation du *p*-crésol

Ainsi à pH 13, les espèces secondaires ne sont que peu ou pas déprotonnées. Le radical *p*-méthyl-phénoxy peut donc être réparé, impliquant une incorporation en deutérium, non pas par le crésol, mais par un de ses produits de radiolyse.

II.4.3.c. Etude de la régiosélectivité par RMN

A cause de l'extrême volatilité du *p*-crésol, celui-ci a été dérivatisé avec le groupement dansylé immédiatement après réaction. C'est donc le spectre RMN 2H du dérivé dansylé (Figure IV-14) qui a été mesuré. Dans cet échantillon, le *p*-crésol a été irradié à p^2H 7 à une plus faible dose que pour les autres composés ($[^2HO^\bullet]_t = 1,24$ mM, *Inc.* (%) = $6,2\% \pm 0,2\%$), car celui-ci se dégrade fortement à haute concentration en HO^\bullet .

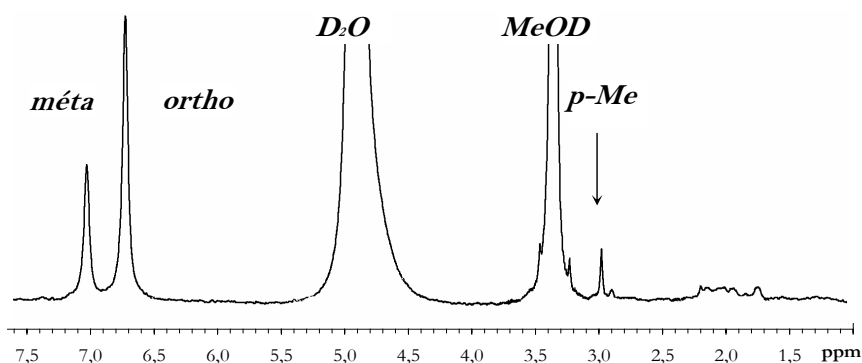


Figure IV-14 : spectre RMN 2H dans MeOD du *p*-crésol irradié, puis dansylé

Le ratio *ortho*/*méta* est dans le cas du *p*-crésol de 2,1. L'incorporation isotopique reflète exactement les densités de spin sur le crésol entre *ortho* et *méta*, car celles-ci sont dans un rapport 2:1 (cf. Tableau I-3, p.145). On observe également une faible incorporation sur le groupement méthyle (à 3 ppm, intensité 0,2 par rapport au *méta*), par un mécanisme d'arrachement d'un hydrogène, remplacé ensuite par un atome de deutérium.

II.4.4. Etude du *N*-acétyl tyrosinamide

II.4.4.a. Etude de la dégradation et de l'incorporation

Cet analogue mime l'effet de la liaison peptidique. La aussi, on élimine la présence de la fonction amine.

On regarde la dégradation, l'incorporation et l'effet de l'ajout de tyrosine sur le comportement. Les conditions opératoires pour l'irradiation et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau IV-13. Les entrées 1 et 2 correspondent au *N*-acétyl-tyrosinamide irradié sans tyrosine (1) et avec tyrosine (2), l'entrée 3 correspond à la tyrosine irradiée sans NAYA (témoin).

Entrée	Composé	$[^2\text{HO}^*]$	%AA	Inc. (%)
1	NAYA	230 μM	25%	9,6% \pm 1,9%
2	NAYA (+Y)	460 μM	39%	10,2% \pm nd
3	Y	230 μM	46%	8,4% \pm 0,2%

Tableau IV-13 : irradiation du *N*-acétyl tyrosinamide ; [NAYA]= [Y]=100 μM , [Pi]=10 mM, pD=7,2, bullage N_2O

Ce que l'on peut constater d'après la Figure IV-11, (p.166) et le Tableau IV-13, c'est que cette molécule incorpore plus de deutérium que la tyrosine à dose égale. Par ailleurs, elle a plus tendance à se dégrader. On observe majoritairement dans ce cas la formation de di-NAYA comme produit secondaire, même si le ratio NAYA-OH/di-NAYA n'a pas pu être déterminé.

II.4.4.b. Etude de la régiosélectivité par RMN

L'étude par RMN ^2H montre que le marquage est localisé uniquement sur le cycle aromatique. Aucun signal n'est détecté sur la chaîne latérale, que ce soit sur la position β ou sur le méthyle du groupe acétyle (Figure IV-15).

Les résultats obtenus (en fonction du pH) sont indiqués dans le Tableau IV-14.

Entrée	pH	%AA	Inc. (%)	o/m	β
1	3,0	24%	11,1% \pm 1,0%	3,1	Pas de signal
2	7,0	30%	6,6% \pm 0,4%	3,3	Pas de signal
3	10,0	32%	8,4% \pm 0,4%	5,1	Pas de signal

Tableau IV-14 : irradiation du *N*-acétyl tyrosinamide ; [NAYA]=800 μM , $[^2\text{HO}^*]$ =1,77 mM, [Pi]=100 mM, bullage N_2O

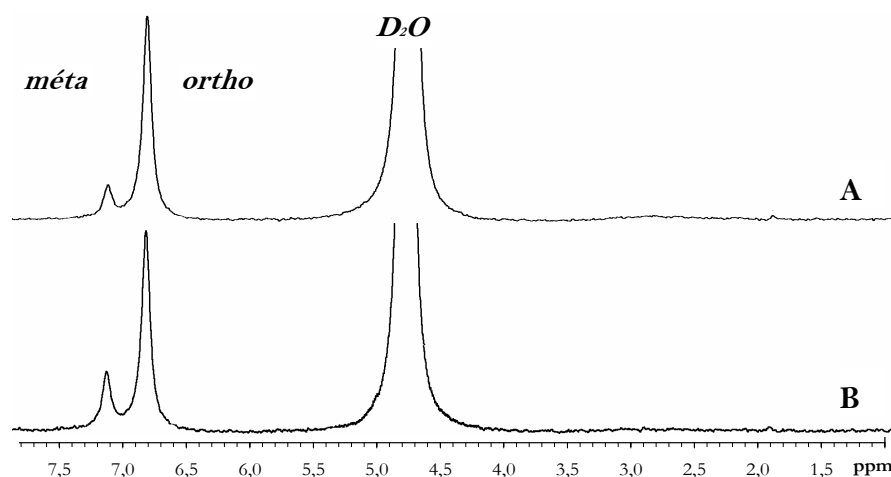


Figure IV-15 : spectres RMN ^2H (D_2O) de NAYA irradié à différents p $^{\text{H}}$; A : p $^{\text{H}}$ 10; B : p $^{\text{H}}$ 3

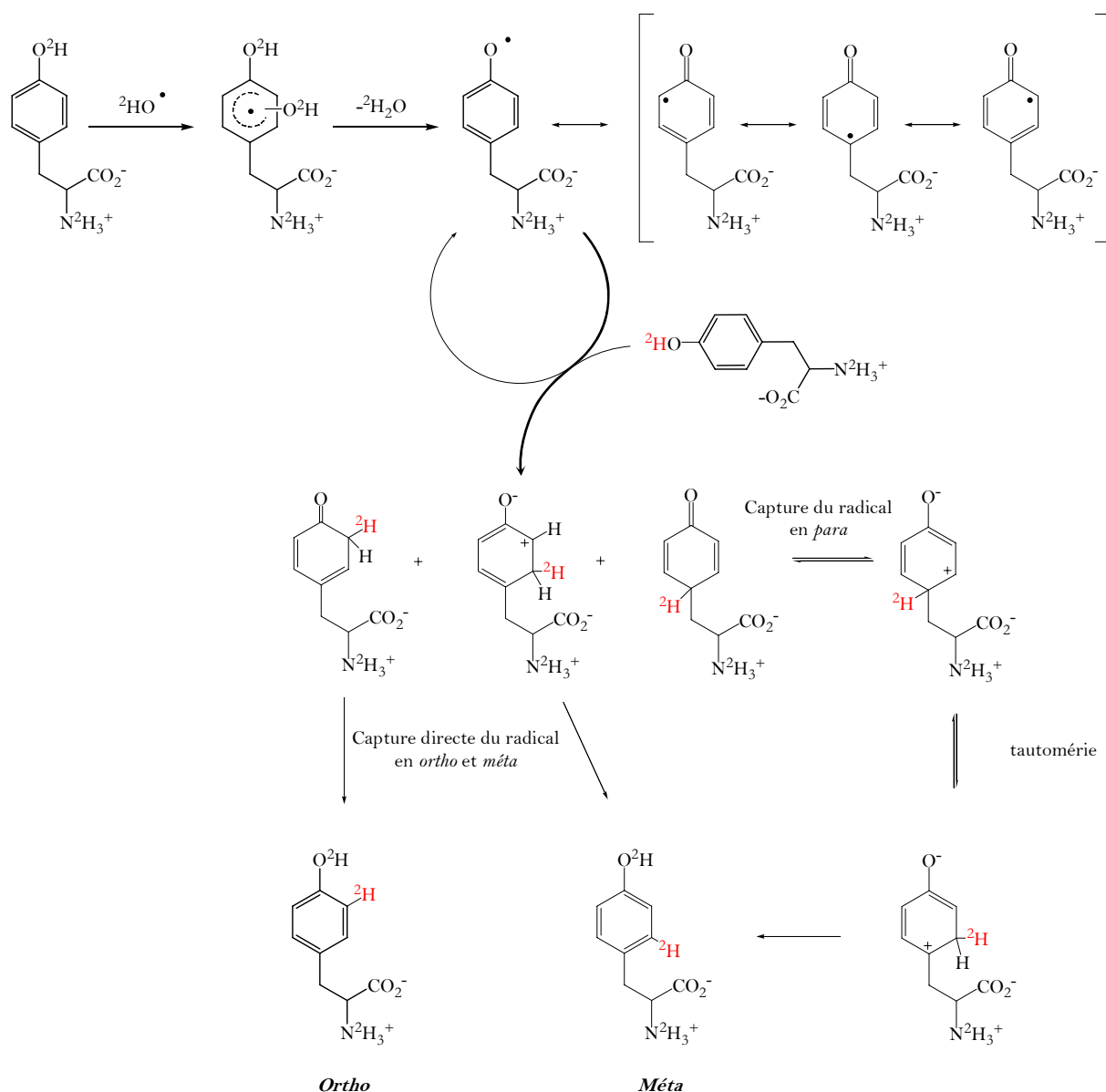
La tendance de l'incorporation en deutérium en fonction du pH est identique à celle de la tyrosine. En revanche, il n'y a pas de différence au niveau du ratio *ortho*/*méta* à pH acide. Une explication possible est que la *N*-acétyl tyrosinamide ne possède qu'un p K_a (celui du phénol), contrairement à la tyrosine, pouvant indiquer que la partie acide carboxylique de cette dernière influe à la fois sur la teneur en deutérium et la régiosélectivité à bas pH.

L'étude par radiolyse de cet analogue montre donc que la fonction phénol est essentielle pour la réparation et que la fonction amine n'intervient pas dans ce processus. Cependant, il est intéressant de noter que ces deux molécules ne présentent pas le même comportement vis-à-vis de l'attaque des radicaux hydroxyle. L'incorporation calculée et la dégradation sont du même ordre de grandeur, en revanche, les produits obtenus diffèrent puisque dans le cas de NAYA on observe une quantité non négligeable de diNAYA. La chaîne latérale intervient donc dans ce processus, mais cela est difficile à interpréter.

II.4.5. Mécanisme d'autoréparation

Ce mécanisme est proposé pour un pH < p K_a (Schéma IV-19). Il passe par le radical phénoxy (cf. expérience avec $\text{Br}_2^{\bullet-}$).

La première étape consiste en l'addition sur le cycle du radical hydroxyle, majoritairement en *ortho* et *méta*, comme cela a été démontré par l'équipe de Solar.¹ En l'absence d'oxydant (solution désoxygénée), les dérivés dihydroxylés stables (2,4-DOPA et 3,4-DOPA), dont les mécanismes de formation ont été décrits à la partie I, apparaissent de manière très minoritaire surtout pour l'isomère *méta*.

Schéma IV-19 : Régénération de la tyrosine par échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ sur le cycle benzénique

Les adduits hydroxylés formés expulsent alors une molécule d'eau pour donner le radical phénol ; une fois que ce produit apparaît, le phénomène de restitution de la tyrosine débute.

Le mécanisme majoritaire est la capture d'un atome de deutérium provenant de la fonction phénol de la tyrosine par l'oxygène du radical tyrosyle. Ce processus est "silencieux" en ce qui concerne l'incorporation en deutérium. En effet, l'atome de deutérium du phénol va capturer le radical tyrosyle, formant de nouveau une liaison O- ^2H . Ce deutérium, facilement échangeable, sera remplacé immédiatement par un atome d'hydrogène en milieu non deutéré.

Cependant, les études menées à la fois sur la tyrosine et sur ses analogues montrent que les positions *ortho* et *méta* incorporent du deutérium ; le radical délocalisé sur l'ensemble du cycle benzénique, l'oxygène et même la partie alanine peut être capturé par un atome de

deutérium provenant lui aussi du phénol de la tyrosine. La liaison ainsi créée est stable, i.e. le processus est irréversible : l'atome de deutérium ainsi incorporé peut facilement être quantifié sans se soucier des processus labiles.

Le piégeage en *para* est lui-aussi silencieux par perte directe de l'atome de deutérium qui restaure l'aromaticité du cycle.

Etant un phénomène minoritaire, l'introduction de deutérium en position β n'est pas représentée ici. De plus, ce mécanisme a déjà été décrit par Anderson²¹ et Lukeman.²² Il réfère au passage par un intermédiaire pseudo quinone.

Le marquage en *ortho* provient directement du piégeage du radical en *ortho* (selon la densité de spin et les formules mésomères). Pour le marquage en *méta*, on peut imaginer deux voies d'incorporation.

La première repose sur le fait que la densité de spin en position *méta* est certes faible, mais demeure néanmoins non nulle. Ce n'est pas forcément la représentation que l'on peut avoir *via* l'observation des formes mésomères, qui sont des formes limites ; les positions *ortho* et *para* sont indubitablement les plus riches en électrons, mais les orbitales des positions *méta* sont tous de même accessibles à l'électron non apparié. La densité de spin en *méta* représente 20% de celle en *ortho* et *para* pour le radical tyrosyle. Dès lors, une capture du spin sur cette position est possible et conduit à une incorporation en *méta*. Cependant, le ratio des intégrations *ortho*/*méta* calculé par RMN ²H est plus proche de 30% que de 20%. Il existe donc une autre voie pour l'incorporation en *méta*.

Les formes mésomères ainsi que la distribution de densité de spin prédisent une localisation privilégiée du radical en *ortho* mais aussi en *para* du phénol. Il peut donc être piégé de la même manière par le deutérium de la fonction phénol en *para*. Pour restaurer l'aromaticité du cycle, il y a tautomérie sur la position *méta* adjacente, puis perte d'un proton, et régénération de la tyrosine.

Ce mécanisme permet de comprendre la régiosélectivité du marquage, avec une incorporation en position *ortho* plus importante qu'en *méta*. Ce qui est original dans ce mécanisme, c'est l'observation du marquage sur les positions benzéniques, montrant la formation des radicaux carbonés ainsi que leur piégeage, et ce sans ajout d'oxydant supplémentaire. Les espèces réactives ainsi créées viennent arracher le deutérium phénolique et régénèrent la tyrosine. Dans les études précédentes, dont il est question dans la partie bibliographique, il n'a jamais été fait mention d'une telle capacité de l'acide aminé à se réparer, du moins par piégeage des radicaux carbonés. Ce processus fait souvent référence à des

phénomènes délétères, comme la formation de produits hydroxylés¹⁴ ou de dimère¹³. C'est en cela que l'ensemble des travaux réalisés par radiolyse a mis au jour un phénomène nouveau et apporte aussi une explication au devenir du radical, puisqu'auparavant, le phénomène de disparition de Tyr• était inconnu.⁴⁴

Conclusion

L'étude du comportement de la tyrosine vis-à-vis de la radiolyse est un phénomène plutôt bien décrit dans la littérature en ce qui concerne les produits de dégradation. Nos travaux menés dans l'eau deutérée nous ont permis de constater un phénomène de restitution jusque là inconnu. Ce phénomène vient donc compléter les données actuelles.

Le marquage au deutérium représente un moyen grâce auquel il est possible d'une part de quantifier le ratio radical capturé/radical créé et d'autre part d'analyser la régiosélectivité de l'attaque des radicaux hydroxyle. La méthodologie mise au point est très reproductible. Le couplage entre spectrométrie de masse et RMN ²H se révèle être un outil fiable et indispensable pour l'étude de l'incorporation et de la régiosélectivité.

La modification des conditions de réaction (utilisation d'un autre oxydant, d'analogues du substrat) nous a permis de proposer un mécanisme pour le phénomène de régénération observé. Celui-ci tient compte à la fois de la nature des intermédiaires formés au cours de la radiolyse, des valeurs de densité de spin, représentant la valeur de la distribution réelle par rapport aux formes limites représentées par la mésomérie, ainsi que de la régiosélectivité observée. Le processus de régénération s'enclenche après formation du radical phénoxy. Le radical ainsi formé est délocalisé sur l'oxygène et sur l'ensemble du cycle benzénique, voire sur la partie alanine. Le phénol de la tyrosine intacte peut alors capturer chacune des positions où le radical se trouve. Ainsi ce sont les positions β, méta et ortho qui sont par ordre croissant les positions les plus marquées. Aucun marquage n'est observé en position α.

Il découle de ce mécanisme et, plus généralement, de l'ensemble des expériences effectuées, que l'action des radicaux hydroxyle, formé lors d'un stress oxydant, ou d'espèces réductrices (électron aqueux) ne se traduit pas forcément par des phénomènes délétères. Il existe une voie non négligeable, celle de la régénération, qui tend à être même majoritaire à faibles concentrations en HO•. La tyrosine possède une capacité plus grande que ses analogues à pouvoir s'autoréparer sous l'influence d'espèces réactives. Cela peut expliquer pourquoi ce

cofacteur protéique est le plus utilisé parmi tous les acides aminés par certaines enzymes au cours de leur cycle catalytique.

Même si la réparation du radical Tyr-O[•] *via* la fonction phénol est difficile à quantifier, notre méthode permet d'accéder aux informations concernant les positions du cycle benzénique. Cela signifie, en outre, qu'il est possible d'effectuer un échange ¹H/²H sur la tyrosine, et que celui-ci procède par la formation du radical tyrosyle. Cela laisse entrevoir la possibilité d'observer cet échange sur un radical tyrosyle relativement accessible au solvant au sein d'une protéine, comme c'est le cas pour la catalase bovine. La suite logique de ces expériences serait d'essayer de capturer le radical de la BLC par un atome de tritium plus simple à détecter et à quantifier que le deutérium, en utilisant l'eau tritiée comme vecteur de ³H dans la méthode explicitée au chapitre II.

Bibliographie du chapitre IV

- ¹ S. Solar, W. Solar, N. Getoff, Reactivity of hydroxyl with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 2091-2095.
- ² N. V. Raghavan, S. Steenken, Electrophilic reaction of the hydroxyl radical with phenol. Determination of the distribution of isomeric dihydroxycyclohexadienyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3495-3499.
- ³ G. Albarran, R. H. Schuler, Concerted Effects of Substituents in the Reaction of OH Radicals with Aromatics: The Cresols, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9363-9370.
- ⁴ S. C. Choure, M. M. M. Bamatraf, B. S. M. Rao, R. Das, H. Mohan, J. P. Mittal, Hydroxylation of Chlorotoluenes and Cresols: A Pulse Radiolysis, Laser Flash Photolysis, and Product Analysis Study, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 9837-9845.
- ⁵ G. Albarran, J. Bentley, R. H. Schuler, Substituent Effects in the Reaction of OH Radicals with Aromatics: Toluene, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 7770-7774.
- ⁶ R. H. Schuler, G. Albarran, J. Zajicek, M. V. George, R. W. Fessenden, I. Carmichael, On the Addition of OH Radicals to the Ipso Positions of Alkyl-Substituted Aromatics: Production of 4-Hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one in the Radiolytic Oxidation of p-Cresol, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 12178-12183.
- ⁷ M. Ye, R. H. Schuler, Second-Order Combination Reactions of Phenoxyl Radicals, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1898-1902.
- ⁸ M. J. Lundqvist, L. A. Eriksson, Hydroxyl Radical Reactions with Phenol as a Model for Generation of Biologically Reactive Tyrosyl Radicals, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 848-855.
- ⁹ R. J. Hulsebosch, J. S. van den Brink, S. A. M. Nieuwenhuis, P. Gast, J. Raap, J. Lugtenburg, A. J. Hoff, Electronic Structure of the Neutral Tyrosine Radical in Frozen Solution. Selective ²H-, ¹³C-, and ¹⁷O-Isotope Labeling and EPR Spectroscopy at 9 and 35 GHz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8685-8694.
- ¹⁰ R. Schnepf, A. Sokolowski, J. Müller, V. Bachler, K. Wieghardt, P. Hildebrandt, Resonance Raman Spectroscopic Study of Phenoxyl Radical Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2352-2364.
- ¹¹ Y. D. Wu, C. L. Wong, K. W. K. Chan, G. Z. Ji, X. K. Jiang, Substituent Effects on the C-H Bond Dissociation Energy of Toluene. A Density Functional Study, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 746-750.
- ¹² P. J. Omalley, A. J. MacFarlane, S. E. J. Rigby, J. H. A. Nugent, The geometry and spin density distribution of the tyrosyl radical: A molecular orbital study, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1232*, 175-179.
- ¹³ F. Jin, J. Leitich, C. von Sonntag, The photolysis ($\lambda = 254$ nm) of tyrosine in aqueous solutions in the absence and presence of oxygen. The reaction of tyrosine with singlet oxygen, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1995**, *92*, 147-153.
- ¹⁴ K. R. Lynn, J. W. Purdie, Some pulse and gamma radiolysis studies of tyrosine and its glycy peptides, *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* **1976**, *8*, 685-689.
- ¹⁵ I. Cudina, L. Josimovic, The Effect of Oxygen on the Radiolysis of Tyrosine in Aqueous Solutions, *Radiat. Res.* **1987**, *109*, 206-215.
- ¹⁶ Z. Maskos, J. D. Rush, W. H. Koppenol, The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: a comparison with salicylate and tryptophan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *296*, 521-529.
- ¹⁷ C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 729-736.

-
- 18 S. M. Kim, S. Han, Tyrosinase scavenges tyrosyl radical, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 312, 642-649.
- 19 B. M. Hoey, J. Butler, Repair of oxidised amino acid units in proteins by antioxidants, *Life Chem. Reports* **1985**, 3, 80-90.
- 20 R. H. Bisby, S. Ahmed, R. B. Cundall, Repair of amino acid radicals by a vitamin E analogue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 119, 245-251.
- 21 R. E. London, S. A. Gabel, Photoactivated H/D Exchange in Tyrosine: Involvement of a Radical Anion Intermediate, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2268-2275.
- 22 B. N. Nukuna, M. B. Goshe, V. E. Anderson, Sites of hydroxyl radical reaction with amino acids identified by ^2H NMR detection of induced $^1\text{H}/^2\text{H}$ exchange, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1208-1214.
- 23 M. Lukeman, P. Wan, A New Type of Excited-State Intramolecular Proton Transfer: Proton Transfer from Phenol OH to a Carbon Atom of an Aromatic Ring Observed for 2-Phenylphenol, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9458-9464.
- 24 D. J. Fairley, D. R. Boyd, N. D. Sharma, C. C. R. Allen, P. Morgan, M. J. Larkin, Aerobic Metabolism of 4-Hydroxybenzoic Acid in Archaea via an Unusual Pathway Involving an Intramolecular Migration (NIH Shift), *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 6246-6255.
- 25 P. Kiuru, K. Wähälä, dans *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*; U. Pleiss, R. Voges, Eds.; John Wiley & Sons, Ltd, **2000**; Vol. 7.
- 26 T. N. Das, Redox Chemistry of 3-Iodotyrosine in Aqueous Medium, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 426-433.
- 27 T. N. Das, R. E. Huie, P. Neta, Reduction Potentials of SO_3^- , SO_5^- , and $\text{S}_4\text{O}_6^{3-}$ Radicals in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 3581-3588.
- 28 I. Saito, H. Sugiyama, A. Yamamoto, S. Muramatsu, T. Matsuura, Photoinduced reactions. 158. Photochemical hydrogen-deuterium exchange reaction of tryptophan. The role of nonradiative decay of singlet tryptophan, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4286-4287.
- 29 D. A. Malencik, J. F. Sprouse, C. A. Swanson, S. R. Anderson, Dityrosine: Preparation, Isolation, and Analysis, *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 202-213.
- 30 G. Gill, A. A. Richter-Rusli, M. Ghosh, C. J. Burrows, S. E. Rokita, Nickel-Dependent Oxidative Cross-Linking of a Protein, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 302-309.
- 31 I. Ayala, K. Range, D. York, B. A. Barry, Spectroscopic Properties of Tyrosyl Radicals in Dipeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5496-5505.
- 32 P. G. Williams, H. Morimoto, D. E. Wemmer, Application Of Modern ^3H NMR Techniques to Analysis of Complex Isotopic Products from a Hydrogenation Reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8038-8044.
- 33 B. Hickel, G. Baldacchino, dans *Actions Biologique et Chimique des Rayonnements Ionisants, une introduction*; Nauwelaerts (Editions), Frison-Roche Edition ed.; Tilquin, B, **2001**.
- 34 M. J. Davies, R. T. Dean, dans *Radical-mediated Protein Oxidation: From Chemistry to Medicine*; Oxford University Press Oxford, **1997**.
- 35 J. Chrysochoos, Pulse Radiolysis of Phenylalanine and Tyrosine, *Rad. Res.* **1968**, 33, 465-479.
- 36 J. Feitelson, E. Hayon, Electron ejection and electron capture by phenolic compounds, *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 10-15.
- 37 L. P. Candeias, P. Wardman, R. P. Mason, The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid, *Biophys. Chem.* **1997**, 67, 229-237.
- 38 J. Holcman, K. Sehested, Anisole radical cation reactions in aqueous solution, *J. Phys. Chem.* **1976**, 80, 1642-1644.
- 39 X. Li, W. S. Jenks, Isotope Studies of Photocatalysis : Dual Mechanism in the Conversion of

Anisole to Phenol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11864-11870.

- ⁴⁰ S. Steenken, P. O'Neill, Oxidative Demethoxylation of Methoxylated phenols and Hydroxybenzoic Acids by the OH Radical. An in situ Electron Spin Resonance, Conductometric Pulse Radiolysis and Product Analysis Study, *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 505-508.
- ⁴¹ M. M. Suryan, S. A. Kafafi, S. E. Stein, Dissociation of substituted anisoles: substituent effects on bond strengths, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4594-4600.
- ⁴² P. O'Neill, S. Steenken, D. Schulte-Frohlinde, Formation of radical cations of methoxylated benzenes by reaction with hydroxyl radicals, Ti^{2+} , Ag^{2+} and SO_4^- in aqueous solution. Optical and conductometric pulse radiolysis and in situ radiolysis electron spin resonance study, *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2773-2779.
- ⁴³ M. R. Deakin, P. M. Kovach, K. J. Stutts, R. M. Wightman, Heterogeneous Mechanisms of the Oxidation of Catechols and Ascorbic Acid at Carbon Electrodes, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1474-1480.
- ⁴⁴ M. Audette, Y. Blouquit, C. Houee-Levin, Oxidative Dimerization of Proteins: Role of Tyrosine Accessibility, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 217-220.

Conclusion Générale et Perspectives

Tout au long de ce travail, nous nous sommes intéressé à la réactivité du radical tyrosyle, à la fois en solution et dans les protéines, en particulier dans la catalase bovine.

Nous avons tenté de transposer la méthode de marquage au tritium basée sur un échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ développée au laboratoire pour l'étude d'interaction protéine/protéine afin de localiser le radical tyrosyle de la BLC. Cette méthodologie consiste en la formation du radical sur un résidu tyrosine de la chaîne polypeptidique par traitement de la catalase avec l'acide peracétique et la capture du radical par ajout d'un composé phosphoré capable de transférer un atome d'hydrogène ou de tritium. Les expériences de spectroscopie RPE effectuées pour visualiser de manière directe l'effet de l'ajout de l'agent de piégeage ont donné des résultats plutôt encourageants en montrant la diminution du signal radicalaire en présence du composé. Cependant, les résultats obtenus avec la méthode de marquage ont révélé que la quantité de tritium incorporée dans la BLC était trop faible pour pouvoir être analysée de manière univoque. Néanmoins, nous avons mis au point une méthode d'analyse efficace de la protéine et des peptides obtenus par clivage au NTCB qui pourrait être appliquée lors d'expériences ultérieures de marquage.

D'autres molécules, ayant des propriétés réductrices analogues au vecteur phosphoré, ont été testées et ont montré une meilleure capacité à capturer le radical de la BLC par la méthode de détection utilisant la spectroscopie RPE. Mais avant de réaliser la synthèse de ces composés marqués par un atome de tritium, nous avons voulu quantifier la réactivité intrinsèque de l'ensemble de ces molécules vis-à-vis du radical tyrosyle en solution, afin de comprendre les mécanismes impliqués lors de l'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$. Il est en effet important de vérifier que l'introduction de l'isotope est irréversible et suffisante pour permettre une détection probante.

Ainsi, le radical phénoxy formé par attaque des radicaux hydroxyle (générés par radiolyse γ de l'eau) sur la tyrosine a été soumis à l'action réparatrice de chacun des composés. Parmi les différentes substances testées, deux se sont avérées plus efficaces que le vecteur originel : le phosphite de diméthyle et l'hydrure de germanium. D'autre part, au cours de cette étude, nous avons mis en évidence un phénomène inconnu : la restitution de la tyrosine. En effet, lorsque la tyrosine est irradiée seule dans l'eau deutérée, une incorporation de deutérium sur l'acide aminé a été mesurée.

La spectrométrie de masse et la RMN ^2H se sont révélés être des outils efficaces pour l'étude de ce phénomène. Grâce à l'utilisation d'une espèce oxydante autre que le radical hydroxyle et à l'étude du comportement d'analogues de la tyrosine, nous avons étudié plus finement cette observation, ce qui nous a permis de proposer un mécanisme pour le résultat

observé. L'incorporation procède *via* la réaction entre le phénol de la tyrosine et le radical phénoxy et est relativement bien corrélée à la distribution de la densité de spin calculée sur le radical tyrosyle. De plus, elle est, à faible concentration en HO•, un processus majoritaire, et peu de produits de dégradation sont observés.

A la suite de l'ensemble de ces résultats, plusieurs perspectives se dégagent. En ce qui concerne la localisation du radical tyrosyle de la catalase bovine, les expériences de spectrométrie de masse en cours peuvent nous permettre de connaître la réactivité des composés phosphorés utilisés tout au long de cette étude, et éventuellement de situer le site d'oxydation. Afin de compléter ces résultats, nous proposons de mettre au point une méthode de marquage dans laquelle l'eau tritiée serait le vecteur d'incorporation. Si le taux d'enrichissement de l'acide aminé s'avère être suffisant, la localisation pourrait être alors rapidement obtenue en appliquant la méthode mise au point lors du chapitre II. Ainsi, on s'affranchirait également du manque d'accessibilité hypothétique du vecteur au site actif de l'enzyme. Toute la difficulté, de cette méthode réside cependant dans le fait qu'il faut absolument bannir toute dilution isotopique, mais ce défi peut aboutir sur une méthode relativement simple et élégante de piégeage du radical et permettre d'élucider le résidu oxydé pendant le cycle catalytique de la catalase.

Bien qu'il ne soit pas *a priori* nécessaire d'utiliser un vecteur pour marquer la catalase, tout le travail effectué sur les différents réducteurs peut être mis à profit pour concevoir un meilleur agent de tritiation que le sel de l'acide phénylphosphinique, qui a montré ses limites pour la réparation de composés aromatiques. L'utilisation d'un réducteur comme le phosphite de diméthyle représente une amélioration puisque d'après les résultats préliminaires, il permet, même à faible concentration, une meilleure incorporation en deutérium (ou en tritium) que le sel de l'acide phénylphosphinique. Il s'agirait d'effectuer ainsi un criblage de tous les acides aminés pour une molécule donnée, pour ensuite en déduire une relation structure-activité. Ainsi, on pourrait utiliser le composé le plus enclin à marquer les acides aminés pour améliorer la méthode de caractérisation de zones d'interaction protéine-protéine développée au laboratoire.

Enfin, il est nécessaire de comprendre *in fine* le comportement des acides aminés lors des phénomènes de radiolyse car certaines données publiées sont lacunaires ou erronées. Il faudrait donc transposer à chacun la méthode appliquée à la tyrosine, pour voir si des phénomènes d'autoréparation sont également constatés, et, le cas échéant, déterminer le mécanisme intervenant.

Chapitre V. Matériel et Méthodes

I. Spécifications et préparations générales

I.1. Instrumentation

RMN	<p>✖ Spectromètre Bruker Advanced 400 MHz, opérant aux fréquences de 400,1 MHz pour le noyau ^1H, 100,6 MHz pour le noyau ^{13}C, 149,2 MHz pour le noyau ^{119}Sn.</p> <p>Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant de référence (TMS) pour ^1H et ^{13}C, SnMe_4 pour ^{119}Sn.</p> <p>Les constantes de couplages sont données en Hz.</p> <p>✖ Spectromètre Bruker Advanced 600 MHz, équipé d'une cryosonde deutérium, opérant à la fréquence de 92,1 MHz pour le noyau ^2H.</p> <p>Les signaux du proton sont découplés en utilisant WALTZ16.</p> <p>Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au signal du deutérium résiduel dans l'eau à 4,79 ppm.</p>
RPE	<p>Spectromètre Bruker ES-300 avec une cavité standard TE102 équipé d'un cryostat Oxford Instrument à hélium liquide, d'un fréquencemètre Hewlett Packard model 5350B.</p>
IR	<p>Spectromètre Perkin-Elmer System 2000 FT-IR.</p> <p>Le traitement des spectres est effectué avec le programme IR Data Manager</p> <p>Les échantillons liquides sont placés entre deux pastilles de NaCl. Une pastille de KBr est préparée pour les échantillons solides.</p>
SM	<p><u>Basse résolution</u> :</p> <p>En mode électrospray couplé au temps de vol, les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Mariner™ ESI TOF (PerSeptive Biosystems).</p> <p>En mode électrospray couplé au quadripôle (LC-MS), les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Waters Micromass Zq. Le système de séparation et purification en amont est équipé de deux pompes à solvant Waters 2525 et Waters 515, d'un dégazeur Waters, d'un collecteur de fraction Waters 2767 et d'un détecteur à photodiode Waters 2996.</p>
UV	<p>Spectrophotomètre Uvikon 922.</p>

Séquençage	Séquenceur de peptide ABI 492 HT/Procise d'Applied Biosystems avec une acquisition sur Procise 1.1 et le logiciel Model 610A 1.1, relié à un collecteur de fraction Gilson FC 203B.
Scintillation liquide	Compteur par scintillation liquide Wallac 1409 utilisant le programme 1414 WinSpectral et de cocktail de scintillation Zinsser Analytic Unisafe 1.
Détection radioactive	β -imager (Biospace, Paris, France) les données sont acquises par caméra CCD, les programmes BV Acquisition™ and BV Zoom. La plus faible activité détectée est 0,007 cpm.mm ⁻² pour ³ H (une désintégration chaque 150 min.mm ⁻²).

I.2. Chromatographie liquide

CCM	Silice Merck 60 F ₂₅₄ d'épaisseur 0,25 mm sur support de verre Visualisation par UV à 254 nm ou 366 nm, révélation avec KMnO ₄ ou acide phosphomolybdique.
Colonne ouverte	Gel de silice Merck (230-400 mesh). La chromatographie liquide est menée selon les procédures standard.

I.3. Chromatographie liquide haute pression

Analyse et purification des composés radioactifs

- Chaîne HPLC semi-préparative : Détecteur UV Merck L-4200 UV-Vis et détecteur radioactif Berthold Nuclear Spectrometer LB2040.
- Chaîne HPLC analytique ou semi-préparative comprenant une pompe Merck Hitachi L-7100 utilisant le système de dégazage Degazys DG-1310 UniFlows, et connectée à un détecteur UV-Vis Shimadzu SPD-10AVP et un détecteur par scintillation liquide Radioflow LB509 utilisé avec le cocktail de scintillation Quickszint flow 302. L'acquisition des données se fait via le logiciel de chromatographie Borwin.

Analyse et purification des composés non radioactifs

Chaîne HPLC Shimadzu comprenant deux pompes à solvant LC-10ADVP, utilisant le système de dégazage Degazys DG-1310 UniFlows, commandées par un module contrôleur Shimadzu. Le suivi de l'absorbance s'effectue par un détecteur UV-visible Shimadzu SPDC-10AVP. Le

logiciel utilisé pour l'acquisition des chromatogrammes est le logiciel fourni par Shimadzu, LC solutions.

I.4. Procédures de distillation des solvants communs:

CH₂Cl₂	Distillé sur hydrure de calcium.
THF	Distillé sur sodium / benzophénone
Ether	Distillé sur sodium / benzophénone.

II. Produits commerciaux

Tous les produits chimiques à l'exception de ceux décrits autrement ont été achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés sans purification supplémentaire. La tyrosine-*d*7 (99,5% d'atomes D) et l'eau deutérée (99,9% d'atomes D) ont été fournies par Eurisotop. La catalase de foie de bœuf (Beef Liver Catalase, BLC) provient de chez Roche, l'oxyde de platine (IV) (PtO₂) de chez Merck, le gaz tritium (98,9% tritium, 0,7% deutérium, 0,4% hydrogène) de chez Tritec, le protoxyde d'azote (qualité UHP, contenant moins d'1ppm d'O₂) provient d'Air Liquide.

III. Procédures expérimentales pour la purification de la BLC

La solution verdâtre de catalase de foie de bœuf est stockée dans du sulfate d'ammonium 3 M.

La purification se divise en trois étapes :

- dialyse de la solution
- purification sur colonne échangeuse d'ions
- dialyse et concentration

A chacune des étapes on mesure le spectre d'absorption, notamment au niveau de la bande de Soret, pour déterminer la concentration en enzyme et définir le rapport $R_z = \frac{DO_{280}}{DO_{405}}$.

Plus il est proche de l'unité, meilleur sera l'enrichissement en hème. On va donc séparer par chromatographie d'échange d'ions la BLC selon le taux d'hème qu'elle contient.

III.1. Dialyse préliminaire

Pour enlever le tampon initial, on place la solution de catalase (25 mL) à 4°C dans un boudin de dialyse (MWCO 12-14000 Da) puis on la dialyse contre 1 L de tampon Tris-HCl 25 mM. Le tampon est changé toutes les heures quatre fois, puis laissé toute la nuit sous agitation. Le lendemain, la solution étant encore trouble, on laisse la dialyse se poursuivre avec trois changements de tampon supplémentaires. La solution marron obtenue (30 mL) est ensuite centrifugée dans des tubes centricones de 15 mL à 3000 g pendant 20 minutes, le surnageant est enlevé. L'opération est renouvelée deux fois. La solution concentrée finale (5,3 mL) est de couleur marron foncé.

III.2. Purification par colonne échangeuse d'ions

En chambre froide, on prépare deux solutions mères pour effectuer la séparation :

- 1 L de solution de Tris-HCl 1 M pH 7,5
- 1 L de solution de NaCl 1 M

On éluera en augmentant la force ionique par ajout de NaCl.

Le gel utilisé pour effectuer la séparation par colonne échangeuse d'ions est du gel Whatman DE52. On prélève 300 mL de gel que l'on met à incuber dans du tampon Tris 25 mM, NaCl 500 mM (3 lavages), puis rinçage dans une solution de Tris 25 mM.

Dans une colonne de 100 mL on coule le gel (70 mL). Une fois le gel déposé, on passe environ cinq volumes de colonne de tampon 25 mM.

La colonne est ensuite chargée avec l'échantillon. On analyse chaque fraction en mesurant son spectre d'absorption. On passe un volume de colonne de tampon Tris 25 mM sans constater de migration de l'enzyme (débit 1,9 mL/min), ni d'apparition de bande en spectrophotométrie.

En passant à l'éluant Tris 25 mM NaCl 20 mM, une bande à 280 nm apparaît. En revanche, il n'y a pas de bande à 405 nm. Il s'agit donc d'une impureté qui est ensuite mise de côté. Dès que la bande disparaît on augmente la concentration en sel. En utilisant le tampon Tris 25 mM, NaCl 50 mM, on constate que l'enzyme commence à migrer. Dès que l'on obtient un spectre d'absorption qui présente à la fois une bande à 280 et à 405 nm, on met en place le collecteur de fractions, puis on augmente la force ionique en passant à 80 mM en NaCl. En fin de colonne, on est à 25 mM Tris, 120 mM NaCl.

On obtient environ 150 fractions de 2 mL chacune selon la force ionique obtenue. Les fractions sont ensuite regroupées entre elles selon leur R_z pour obtenir six lots. Plus on augmente la force ionique, plus le R_z est élevé.

III.3. Dialyse et concentration

Les fractions 1 et 2 sont directement dialysées contre du tampon Tris 25 mM. Les autres sont concentrées pour obtenir des volumes de l'ordre de 10 – 15 mL, puis dialysées contre du tampon Tris 25 mM. La dialyse est effectuée dans des béchers d'un litre, à 4°C, avec six-sept changements de tampon.

Après dialyse les échantillons sont concentrés (centricon 100 puis 10) afin d'obtenir des volumes inférieurs à 1 mL (Tableau V-1).

<i>N° fraction</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Concentration (μM)</i>	<i>R_z</i>
1	0,2	141	1,03
2	1,4	427	1,06
3	1,3	649	1,10
4	0,5	226	1,18
5	0,5	258	1,20
6	0,3	77	1,23

Tableau V-1 : obtention des différents lots de BLC

IV. Procédures expérimentales pour les expériences de RPE

IV.1. Vérification de la solubilité

Des solutions mères à 20 mM sont préparées. Selon la solubilité de chacun des produits dans l'eau, celle-ci est diminuée aléatoirement jusqu'à complète dissolution du produit.

IV.2. Vérification de la stabilité vis-à-vis de l'acide peracétique

Des solutions dans D₂O à 20 mM sont préparées de chacun des composés hydrosolubles. Le spectre RMN ¹H de ces solutions est ensuite mesuré.

On ajoute ensuite du tampon Tris-Maléate 500 mM tel que la concentration finale dans le tube en tampon soit de 50 mM. On mesure le spectre RMN ¹H.

Enfin on ajoute le même nombre d'équivalent d'acide peracétique que celui utilisé pour la manip RPE (i.e. 75eq.). On mesure le spectre RMN ^1H .

IV.3. Mise au point des conditions expérimentales pour la RPE

IV.3.1. Détermination des conditions de mélange optimales

Dans ces expériences, les échantillons sont préparés à partir de catalase native à une concentration de 32 mg/mL (130 μM , $\epsilon = 0,324 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Le tampon utilisé est du Tris-maléate 50 mM à pH 7,6 pour l'enzyme, et à pH 6,0 ou 7,6 pour l'acide peracétique. Des résultats antérieurs ont montré que la quantité de radicaux tyrosyle créée est beaucoup plus forte quand on utilise un acide peracétique à bas pH (3,2 plutôt que 4,7), correspondant à un tampon à pH 6,0.

Des expériences précédentes ont permis de mettre au point les conditions de réaction afin d'optimiser la quantité de radical tyrosyle formée. On reproduit ces expériences afin de confirmer si le lot de BLC réagit de manière identique (Tableau V-2).

La catalase est placée directement dans un tube de RPE dans la glace. On ajoute ensuite l'acide peracétique, on mélange pendant quelques secondes. Ensuite le tube de RPE contenant la solution est congelé dans un mélange éthanol/carboglace puis plongé dans de l'azote liquide.

<i>Réactif</i>	<i>Concentration initiale</i>	<i>Volume solution (μL)</i>	<i>Concentration finale</i>	<i>Quantité (nmol)</i>	<i>Nombre d'éq. /BLC</i>
BLC	130 μM	60,0	80 μM	7,8	1
PAA	42 mM	27,5	11,85 mM	1155	148

Tableau V-2: Quantité optimale de chacun des réactifs

Plusieurs temps de mélange sont testés. Les meilleurs résultats sont obtenus avec un temps de mélange de 15 s.

La solution congelée est analysée par RPE à 4 et 40 K. À 4 K, on observe le métal et le radical tyrosyle, mais l'intensité de celui-ci est légèrement saturée. Pour obtenir le vrai signal du radical avec les couplages hyperfins, on mesure le spectre RPE à 40 K.

On laisse ensuite le tube se décongeler dans la glace, on recongèle le tube et on mesure de nouveau le spectre RPE.

IV.3.2. Détermination des conditions de mélange avec le vecteur

On ajoute maintenant le vecteur (10 μL pour ne pas trop diluer l'échantillon initial) après 10 s de mélange BLC-PAA, puis on agite 5 s et congèle. On regarde par rapport au témoin (avec 10 μL de tampon supplémentaire) l'influence sur le spectre RPE.

<i>Témoin</i>	<i>Expérience</i>
❶ 60 μL BLC 130 μM pH 7,4 à 0°C	
❷ Ajout 27,5 μL PAA 42 mM pH 3,7 et mélange 10 s à 0°C	❷ Ajout 27,5 μL PAA 42 mM pH 3,7 et mélange 10 s à 0°C
❸ Ajout 10 μL tampon et mélange 5s à 0°C	❸ Ajout 10 μL vecteur 770 μM et mélange 5 s à 0°C
❹ Congélation /spectre RPE	
❺ Décongélation dans la glace 3min	
❻ Recongélation /spectre RPE	

Tableau V-3 : préparation de l'échantillon analysé par RPE en présence du sel de l'acide phénylphosphinique

IV.3.3. Influence de l'incubation

Préparation des échantillons : On réalise cet essai avec l'acide 4-méthoxyphénylphosphinique. Les conditions sont résumées dans le tableau suivant.

<i>Témoin</i>	<i>Solution incubée</i>	<i>Solution non incubée</i>
❶ 60 μL BLC 130 μM pH 7,4 à 0°C		
❷ Ajout 27,5 μL PAA 42 mM pH 3,7 et mélange 10 s à 0°C	❷ Ajout 10 μL vecteur 770 μM : incubation 10 min TA	❷ Ajout 27,5 μL PAA 42 mM pH 3,7 et mélange 10 s à 0°C
❸ Ajout 10 μL tampon et mélange 5 s à 0°C	❸ Ajout 27,5 μL PAA 42mM pH 3,7 et mélange 15 s à 0°C	❸ Ajout 10 μL vecteur 770 μM et mélange 5 s à 0°C
❹ Congélation /spectre RPE		
❺ Décongélation dans la glace 3 min		
❻ Recongélation /spectre RPE		

Tableau V-4 : préparation de l'échantillon analysé par RPE en présence d'acide 4-méthoxy-phénylphosphinique avec et sans incubation

V. Procédures expérimentales pour les expériences de spectrophotométrie UV-visible et spectrométrie de masse avec la BLC

V.1. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible sont mesurés sur la plage 200 - 700 nm, à la vitesse de 1000 nm/sec, à 15°C (bain thermostaté).

On mesure avant tout les témoins :

- tampon tris-maléate 50 mM pH 7,6
- mélange BLC/PAA
- mélange vecteur/PAA

Pour chaque échantillon, on mesure le spectre à t=0 (enzyme native sans PAA), puis à 30 s après ajout du PAA, 1', 1'30, 2', 4', 10', 20', 30', 1h, ou à l'inverse on incube l'enzyme avec le vecteur pendant 40 min à TA, puis on ajoute l'acide peracétique.

<i>Entrée</i>	<i>Réactif</i>	<i>Concentration initiale</i>	<i>Volume solution (μL)</i>	<i>Concentration finale</i>	<i>Quantité (nmol)</i>	<i>Nombre d'éq./BLC</i>
1	BLC	3,1 μ M	700	3,0 μ M	2,2	1
2	PAA	260 mM	5	1,82 mM	1300	600
3	Vecteur	2,8 mM	5	19,7 μ M	14	6,3

Tableau V-5 : Quantité de chacun des réactifs utilisée pour l'étude par spectrométrie UV-visible

Les spectres des solutions sont analysés avec incubation préalable ou non du vecteur. Dans le cas de l'incubation, aucune différence n'est notée dans le spectre entre témoin et échantillon.

V.2. Spectrométrie de masse

Les mêmes conditions que pour les manipulations de RPE sont utilisées (ratio des volumes BLC/PAA, concentration, préparation, temps de mélange) sauf que l'on utilise dix fois moins de protéine.

VI. Procédures expérimentales pour les expériences de marquage

VI.1. Précipitation de la BLC et purification HPLC

La précipitation de la protéine pour retirer l'hème s'effectue par ajout à froid d'une solution d'HCl 1N (1/25) dans l'acétone.¹ La solution est laissée sous agitation pendant deux heures à 4°C. La protéine précipite, le surnageant est écarté, puis l'enzyme est lavée trois fois à l'acétone. Une fois lyophilisée, on reprend la protéine dans du tampon phosphate et on l'analyse par HPLC. Le problème de cette méthode est qu'une fois précipitée, l'enzyme est difficile à solubiliser. On ne peut donc pas la purifier intégralement, on perd beaucoup de matériel. Elle est donc par la suite abandonnée.

La méthode de purification par HPLC s'effectue dans les conditions suivantes :

- ➔ Colonne Kromasil 300 Å, C₁₈, 5µm, 4,6 mm×250 mm
- ➔ Eluant A: HCO₂H 0,1%; éluant B: CH₃CN/HCO₂H 0,1%;
- ➔ Gradient HPLC utilisé : 15→60%B en 30 min; 60%→100%B de 30 à 50 min
- ➔ Débit 1 mL/min

La détection s'effectue par mesure de l'absorption à 220 nm. Le temps de rétention, dans ces conditions, est t_R=26,7 min. Dans toute la suite, la nature du système d'éluants est conservée. Seul le gradient utilisé change.

VI.2. Procédure générale de l'expérience de marquage

A 4°C, une solution de BLC 780 µM (10 µL, 7,8 nmol) est diluée dans du tampon tris-maléate 50 mM pH 7,6 (50 µL) pour obtenir une concentration finale de 130 µM.

De l'acide peracétique 42 mM (14 µL, 588 nmol, 75 éq./tétramère), obtenu par dilution de la solution initiale commerciale (4,2 M dans l'acide acétique) et incubé avec de la catalase diluée pour enlever l'excès de peroxyde d'hydrogène, est ajouté. Après 15 s de mélange, le sel du sel de l'acide phénylphosphinique tritié est ajouté (67 µL d'une solution 2,33 mM, AS = 340 GBq/mmol, 20 éq./tétramère), la solution est mélangée 10 s avant d'être congelée dans l'azote liquide, puis remise à 4°C.

VI.3. Détermination de l'activité spécifique

La quantité de BLC avant marquage est déterminée par mesure de l'absorbance à 405 nm utilisant $\epsilon_{405} = 0,324 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ de l'enzyme native. Après marquage, on mesure la DO de chacune des fractions collectées, ce qui nous permet de connaître les rendements de purification et de connaître la quantité injectée en HPLC. De là, on en déduit :

$$A_{UV_{210nm}} = f(\text{Quantité injectée (nmol)}) = 139841n \text{ avec } n \text{ en nmol.}$$

De même, l'estimation de l'aire radioactive est effectuée par comptage par scintillation liquide. Des composés d'activité spécifique connus (comptés par scintillation liquide) sont injectés en HPLC. Il s'agit soit du composé phosphoré (solution évaporée, reprise dans un volume connu), soit de protéine pour laquelle on a déterminé au préalable la quantité de radioactivité associée par comptage par scintillation liquide. L'équation de la courbe étalon est donnée par $A_{\text{radioactivité}} = f(\text{Quantité injectée (Bq)}) = 12,163x \text{ avec } x \text{ en Bq.}$

VI.4. Mise au point des conditions de purification

Après réaction de marquage, trois méthodes de purification grossières ont été testées afin de limiter la quantité de radioactivité injectée par HPLC dans la cellule radioactive nécessaire à la mesure du chromatogramme :

- ➔ la purification sur cartouche C₂,
- ➔ la purification par chromatographie d'échange d'anions,
- ➔ la purification par filtration sur gel.

Les conditions d'élution (utilisation d'acétonitrile à 70%) de la protéine lors du passage sur colonne C₂ la font précipiter. Il est alors difficile de la solubiliser pour l'analyser et la purifier par HPLC. On a donc une perte importante de matériel. Cette méthode de séparation a donc été abandonnée au profit de la méthode par échange d'ions. Celle-ci permet une bonne séparation entre composé phosphoré et enzyme mais possède un inconvénient majeur : la quantité croissante de sels ajoutée au cours de la purification pour permettre l'élution de la protéine entraîne également des problèmes de solubilité ; elle nécessite par conséquent un dessalage postérieur des solutions par filtration sur gel.

Après ces deux étapes de purification, la protéine est ensuite analysée puis purifiée par HPLC. La plupart de la radioactivité non associée à la protéine a disparu, même s'il reste un peu de vecteur (Figure II-14).

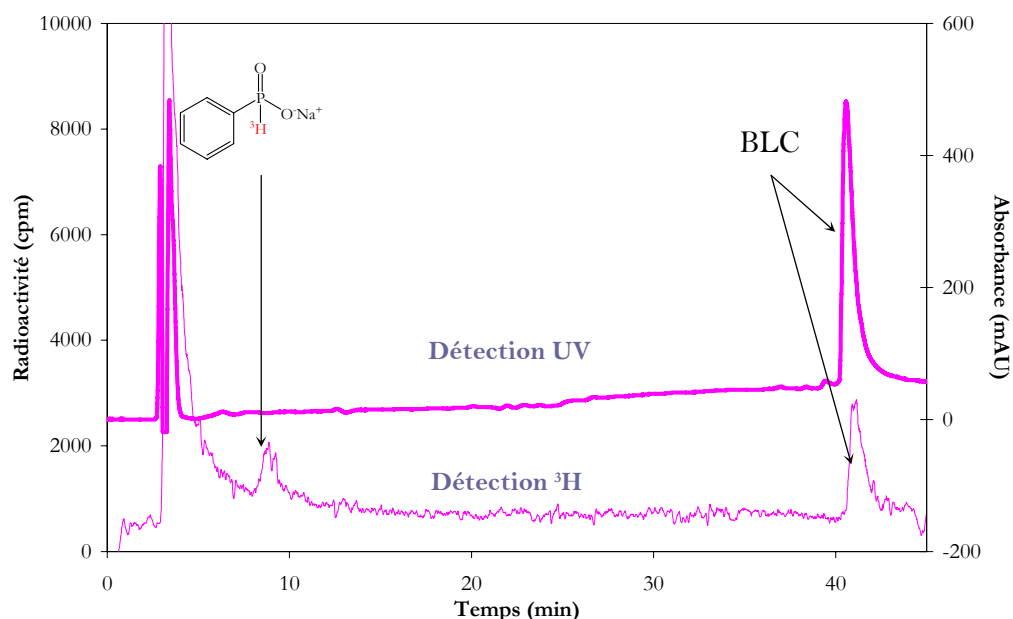


Figure V-1 : Chromatogramme de la BLC marquée après purifications successives par échange d'ions et filtration sur gel, (10 eq. de PhPO_3TNa ($\text{AS } 340 \text{ GBq.mmol}^{-1}$), temps de réaction de 10 min)

Un comptage de la même solution protéique a été réalisé à chaque étape de purification (Tableau V-6).

Entrée	Etape de purification	$\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}}$	Activité spécifique BLC (GBq.mmol^{-1})
1	DEAE	7,8	799*
2	GF	6,1	11
3	HPLC	nd	6

Tableau V-6 : valeur du ratio $\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}}$ du chromatogramme et activité spécifique de la BLC calculée après purification

Pour l'entrée 1, la valeur de l'activité spécifique (*) est faussée par la présence de composés radioactifs autres que la protéine dont les signaux sont saturés sur le chromatogramme. Il est donc impossible d'estimer quelle est la contribution du vecteur à la quantité totale de radioactivité mesurée. Par contre, pour l'entrée 2, on a tenu compte du poids de chacun des composés radioactifs pour déterminer l'activité spécifique vraie de la BLC, la valeur trouvée est du même ordre de grandeur que celle mesurée pour la protéine purifiée par HPLC (entrée 3).

Comme la purification par échange d'ions est assez longue à réaliser et que le rendement de réaction est médiocre (12%), une méthode de filtration sur gel a été mise au point : c'est une méthode de séparation rapide et efficace, ne nécessitant pas l'ajout de sels, ni d'acétonitrile et permettant une bonne séparation des deux entités.

Après trois minutes, la solution est placée sur une colonne de filtration sur gel (séphadex G20, 50 mL). La collecte des fractions est suivie par mesure de l'absorbance à 280 et 405 nm. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées puis lyophilisées. L'analyse et la purification de la protéine marquée sont effectuées par HPLC (cf. VI.1).

VI.5. Contrôle et amélioration du marquage associé à la protéine

On vérifie plusieurs paramètres pour améliorer les conditions de marquage, notamment si la dilution ne modifie pas le taux de marquage et si le marquage est persistant.

✖ Influence du volume

Il s'agit de connaître l'influence de la dilution sur l'incorporation, ce dans le but d'améliorer le taux de marquage en augmentant le nombre d'équivalents obtenus.

L'expérience contrôle a été réalisée en utilisant le même lot de vecteur, mais à des concentrations différentes. Dans ce cas, le taux de marquage reste inchangé quand on ajoute la même quantité de composé tritié. La dilution n'a donc pas ou peu d'effet sur la quantité de marquage de l'enzyme.

Entrée	[vecteur]	Volume ajouté	[BLC]	$\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}}$	AS (GBq.mmol ⁻¹)
1	230 µM	334 µL	18 µM	32,2	370
2	770 µM	100 µL	41 µM	30,7	350

Tableau V-7 : Incorporation calculée pour les expériences de marquage avec une quantité de PhPO₂TNa constante mais de concentration variable (AS 340 GBq.mmol⁻¹, temps de réaction de 3 min)

✖ Persistance du marquage dans le temps

Afin de vérifier que le phénomène de marquage est irréversible, nous avons regardé la perte de signal radioactif entre le moment où la réaction est effectuée et sept jours plus tard (Tableau V-8)

Entrée	Stabilité dans le temps	$\frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}}$	Activité spécifique BLC (GBq.mmol ⁻¹)
1	t=0	19,8	6
2	t=7 jours	17,0	5

Tableau V-8 : vérification de la stabilité du marquage (10 éq. PhPO₂TNa d'AS 355 GBq.mmol⁻¹, temps de réaction de 3 min)

On constate qu'il n'y a quasiment pas de modifications au cours du temps, ce qui sous-entend que c'est bien un processus irréversible par addition de l'atome de tritium sur un radical carbocentré.

VI.6. Digestion peptidique sur BLC non marquée

Pour cliver la BLC, des méthodes enzymatiques et chimiques ont été testées. La séquence primaire de la BLC contient vingt tyrosines. Il est important d'isoler les peptides contenant les deux tyrosines candidates pour le transfert d'électrons, i.e. Tyr259 et Tyr369.

Toutes les coupures théoriques sont données par le logiciel MS-Digest.^X Ci dessous sont représentées les coupures induites par la trypsine (clivage après les résidus Lys et Arg, acides aminés soulignés) sur la séquence primaire de la BLC, toutes les tyrosines sont indiquées en bleu, les deux candidates en rouge.

1	11	21	31	41	51	61	71
ADNRDPASDQ	MKHWKEQRAA	QKPDVLTGG	GNPVGDKLNS	LTVGPRGPLL	VQDVVFTDEM	AHFDRERIPE	RVVHAKGAGA
81	91	101	111	121	131	141	151
FGYFEVTHDI	TRYSKAKVFE	HIGKRTPIAV	RFSTVAGESG	SADTVRDPRG	FAVKFYTEDG	NWDLVGNNTP	IFFIRDALLF
161	171	181	191	201	211	221	231
PSFIHSQKR	PQTHLKDPDM	VWDFWSLRPE	SLHQVSFLFS	DGIPDGHRH	MDGYGSHTFK	LVNADGEAVY	CKFHYKTDQG
241	251	261	271	281	291	301	311
IKNLSVEDAA	RLAHEDPDYG	LRDLFNAIAT	GNYPSTWLYI	QVMTFSEAEI	FPFNPFDLT	VWPHGDYPLI	PVGKLVLNRN
321	331	341	351	361	371	381	391
PVNYFAEVEQ	LAFDPSNMPP	GIEPSPDKML	QGRLFAYPDT	HRHRLGPNYL	QIPVNCPLYRA	RVANYQRDGP	MCMMDNQGGA
401	411	421	431	441	451	461	471
PNYYPNSFSA	PEHQPSALEH	RTHFSGDVQR	FNSANDDNVT	QVRTFYLV	NEEQRKRLCE	NIAGHLKDAQ	LFIQKAVKN
481	491	501					
FSDVHPEYGS	RIQALLDKYN	EEKPKN					

Tableau V-9 : Séquence primaire de la BLC et clivage induit par la trypsine

Il est important que les tyrosines d'intérêt soient facilement analysables par séquençage d'Edman, c'est-à-dire qu'elles soient le plus proche possible de la position N-ter du peptide. En effet, on peut récupérer facilement les dix premiers acides aminés d'un peptide, lors du séquençage, par collecte automatique pour avoir ainsi accès à la valeur de l'absorption de l'acide aminé-PTH, qui, couplée à la valeur de la radioactivité associée à l'acide aminé permet de remonter à la valeur de l'activité spécifique.

Les échantillons non marqués ont été analysés par LC-MS afin de déterminer et localiser la présence des peptides d'intérêt.

^X Il est disponible à l'adresse <http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msdigest.htm>

VI.6.1. Clivage à l'acide formique

Le clivage à l'acide formique permet de cliver les liaisons Asp-Pro, ce qui permettrait d'obtenir six fragments. Des essais ont été réalisés avec des solutions d'acide formique à 2%. Dans ces conditions, malgré le chauffage à 37°C et des temps de réaction de l'ordre de 20 heures, peu d'avancement est constaté, même quand on utilise l'apoprotéine.

VI.6.2. Clivage par le bromure de cyanogène

On clive la chaîne polypeptidique au niveau des méthionines, avec perte du résidu Met. Théoriquement, on forme neuf peptides. Un clivage ultérieur des peptides obtenus par la trypsine devrait permettre d'accéder aux deux tyrosines d'intérêt.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

Une solution de CNBr 8,2 mg/mL dans du TFA 80% est préparée dans l'obscurité. A deux équivalents de protéine, on ajoute un équivalent de CNBr. La solution est laissée sous incubation à température ambiante pendant vingt quatre heures. La solution est ensuite purifiée sur cartouche SepPak C₁₈ (éluant H₂O/HCO₂H 0,1% puis CH₃CN/H₂O/HCO₂H 70/30/0,1%) puis lyophilisée.

Le chromatogramme obtenu dans le cas de la coupure par le CNBr montre une forte dégradation et l'analyse par LC-MS nous permet de détecter le peptide contenant Tyr259 en faible quantité et difficilement séparable, de poids moléculaire 8064 g/mol qu'il faudrait cliver ultérieurement en plus petits peptides. Par contre, on n'arrive pas à déceler la présence du résidu contenant Tyr369. Cette méthode sera abandonnée car elle ne permet pas d'accéder aux deux résidus. De plus, elle présente un double désavantage. D'une part elle s'effectue en milieu très acide, ce qui peut conduire à un échange ¹H/³H pendant la digestion, pouvant conduire à la perte du marquage. D'autre part, elle utilise un réactif très toxique.

VI.6.3. Clivage par l'endoprotéinase V8 (Glu-C)

La protéase V8-E est une protéase extracellulaire extraite de *Staphylococcus Aureus*, clivant les liaisons peptidiques exclusivement après des résidus glutamate (Glu-C).

Y259	DPD Y GLRDLFNAIATGN Y PSWTL Y IQVMTFSE
Y369	PSPDKMLQGR L F A Y PDTHRRLGPN Y LQIPVNCP Y RARVAN Y QRDGPMMMDNQGGAPN Y Y PNSFSAPE

Tableau V-10 : Séquence primaire des peptides d'intérêt obtenus par clivage avec la protéase V8-E

La digestion de la BLC par cette protéase n'est que partielle et relativement longue; elle

nécessite des incubations de plus d'une dizaine d'heures pour des résultats plutôt médiocres, même dans des conditions dénaturantes pour la BLC mais raisonnables pour la protéase (précipitation antérieure de la BLC pour former l'apoenzyme ou réaction dans le SDS). De plus, le peptide contenant Tyr259 n'a pas été détecté par LC-MS. Celui contenant Tyr369 est lui décelé. Par contre, il devra être trypsinolysé pour accéder au résidu par séquençage.

Les conditions expérimentales sont les suivantes:

De la BLC (7,8 nmol) est diluée dans du tampon NH_4HCO_3 pH 7,8 (200 μL). La solution de V8 (10 μL , 67 μg , 3% p/p) est ajoutée et mise à incuber à 37°C pendant 24 h. La solution est ensuite lyophilisée, reprise dans du tampon et injectée en HPLC.

Conditions HPLC :

- ➔ Colonne Kromasil 300 Å, C_{18} , 5 μm , 4,6 mm×250 mm
- ➔ Eluant A: HCO_2H 0,1%; éluant B: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCO}_2\text{H}$ 0,1%;
- ➔ Gradient HPLC utilisé : 2→30%B en 100 min, 30%→40%B en 110 min, 40%→60%B en 120 min, 60%→100%B en 125 min.
- ➔ Débit 0,8 mL/min

VI.6.4. Trypsinolyse

Cette coupure induit la formation de 42 peptides, ce qui rend la purification complexe.² Cependant, cette méthode de clivage est rapide et totale, ne nécessite pas de précipitation antérieure de la BLC avec les problèmes en résultant.

Y259	LAHEDPDYGLR
Y369	LGPNYLRQIPVNCPYR

Tableau V-11 : Séquence primaire des peptides d'intérêt obtenus par clivage avec la trypsine

Expérimentalement, il suffit de mélanger protéine et trypsine (solution 24 mg/mL d'une solution d' HCl 0,1 N) dans le ratio 100/1 (p/p), puis de mettre à incuber 1 h à 37°C dans du tampon NH_4HCO_3 100 mM pH 8. Les peptides résultants sont purifiés par HPLC.

Conditions HPLC :

- ➔ Colonne Kromasil 300 Å, C_{18} , 5 μm , 4,6 mm×250 mm
- ➔ Eluant A: HCO_2H 0,1%; éluant B: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCO}_2\text{H}$ 0,1%;
- ➔ Gradient HPLC utilisé : 2→3%B en 20 min; 3%→10%B de 20 à 40 min; 10%→13%B de 40 à 100 min, 13%→18%B de 100 à 120 min, 18%→23%B de 120 à

170 min, 23%→30%B de 170 à 190 min, 30%→40%B de 190 à 200 min, 40%→100%B de 200 à 220 min.

➔ Débit 0,8 mL/min

Cependant plusieurs problèmes se posent : on n'arrive pas à obtenir tous les peptides et la purification individuelle de chacun des peptides est ardue.

Les résultats sont explicités au chapitre II.

VI.6.5. Clivage NTCB (Cys-C)

Le clivage à l'aide du NTCB (2-nitro-thiocyanobenzoate) permet de cliver de manière assez spécifique la protéine avant les résidus cystéine, mais il est difficile d'obtenir une hydrolyse complète (Schéma V-1.) Théoriquement, par cette méthode, on doit obtenir cinq peptides. Un seul peptide contient les deux candidates, il faudra ensuite le cliver par la trypsine pour obtenir de plus petits fragments.

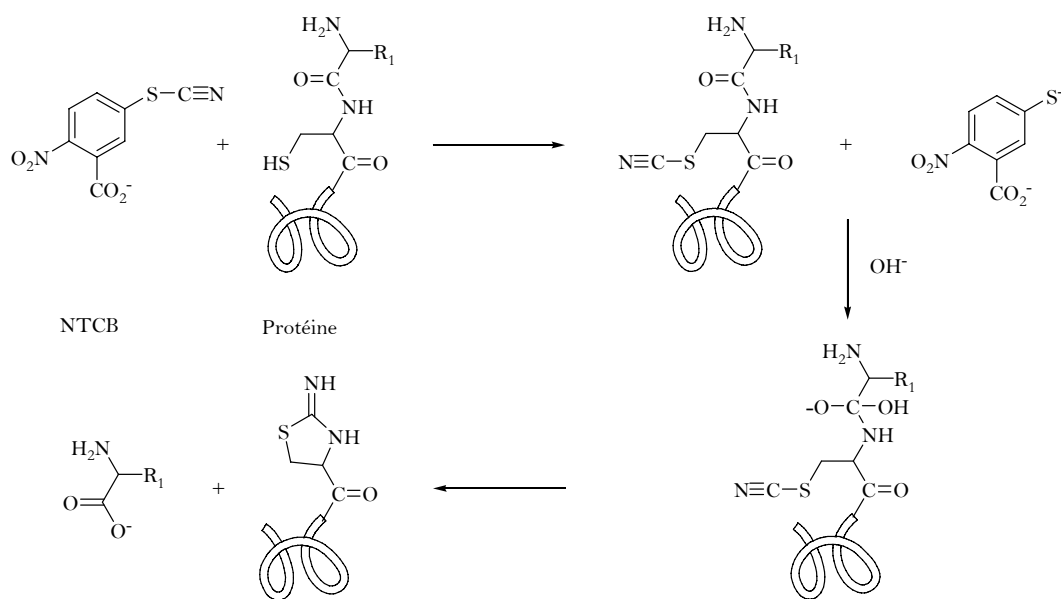


Schéma V-1 : clivage par le NTCB des protéines

La procédure expérimentale est la suivante. Une solution de NTCB utilisée pour la coupure chimique est préparée, contenant 0,7 mg/mL de NTCB dans du tampon glycine 1 M/urée 8 M. Pour un équivalent de cystéine, on ajoute vingt équivalents de NTCB. La solution protéique est ensuite basifiée par ajout de NaOH 5 M, puis incubée pendant 14 h à 37°C.

Après réaction, la solution est acidifiée à l'acide formique jusqu'à pH 4, puis lyophilisée. Le résidu est ensuite injecté en LC-MS dans les conditions HPLC suivantes :

➔ Colonne Kromasil 300 Å, C₁₈, 5µm, 4,6 mm×250 mm

- ➔ Eluant A: HCO_2H 0,1%; éluant B: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCO}_2\text{H}$ 0,1%;
- ➔ Gradient HPLC utilisé : 5 à 20%B en 10 min, 40%B en 70 min, 90%B en 90 min
- ➔ Débit 0,8 mL/min

Sur le chromatogramme (exposé au chapitre II), on observe dix pics majoritaires. L'analyse par masse désigne le pic à $t_R=35,7$ min comme étant le peptide contenant les deux tyrosines d'intérêt. Par contre, peu d'activité est associée à ce pic sur le chromatogramme représentant le signal radioactif.

VI.7. Digestion peptidique sur BLC marquée

VI.7.1. Protéase V8-E

Après collecte du pic correspondant à la BLC marquée, la solution est lyophilisée, puis clivée selon les conditions mises au point avec la protéase.

Lorsque la digestion par la V8 est réalisée, aucun marquage n'est observé sur le peptide contenant Y369, ni sur aucun autre, pouvant provenir d'une absence de réaction de marquage, d'une trop faible quantité de peptides formés, ou d'une conjonction des deux. La digestion par cette enzyme a, par conséquent, été rapidement abandonnée.

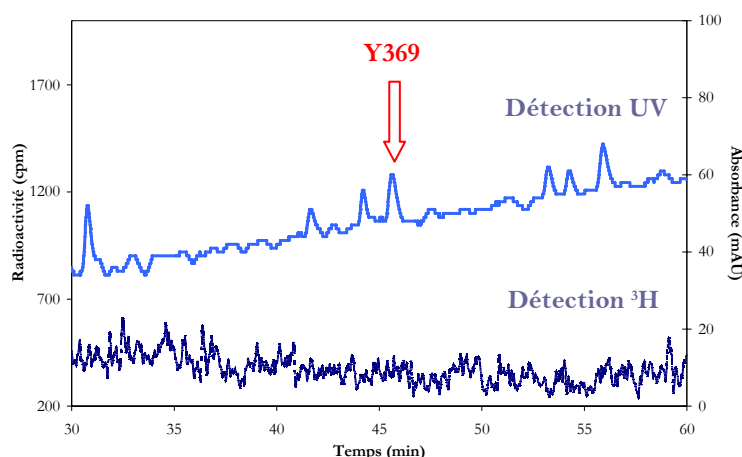


Figure V-2 : Chromatogramme de la BLC digérée par la V8 (10 eq. de PhPO_2TNa ($\text{AS } 320 \text{ GBq.mmol}^{-1}$),

$$\text{temps de réaction de 3 min, ratio } \frac{\text{Aire } ^3\text{H}}{\text{Aire UV}} = 12,2$$

VI.7.2. Trypsine

C'est la méthode de choix dont les résultats sont présentés au chapitre II. Après collecte du pic correspondant à la BLC marquée, la solution est lyophilisée, reprise dans du tampon NH_4HCO_3 100 mM pH 8. De la trypsine (1/10 p/p) est alors ajoutée. Après incubation

à 37°C pendant 24 h, la digestion est injectée en HPLC avec les conditions décrites ci-dessus. Le chromatogramme est mesuré à deux longueurs d'onde, 210 et 280 nm. La détection radioactive pour visualiser les peptides marqués s'effectue avec un débit du scintillant réglé à 1,8 mL/min.

Lors de la purification, on collecte chacun des peptides et les zones de fort marquage, même si les pics associés à cette radioactivité sont quasi inexistantes sur le chromatogramme obtenu par détection UV.

VI.7.3. Clivage NTCB

C'est la méthode alternative de coupure de la BLC dont les résultats sont également présentés au chapitre II.

VI.8. Séquençage des pics actifs et analyse radioactive

Les peptides collectés sont ensuite lyophilisés, puis séquencés par la méthode d'Edman. Lors du séquençage, on obtient le dérivé phénylthio-hydantoïne de l'acide aminé par dérivatisation interne au processus (Figure V-3).

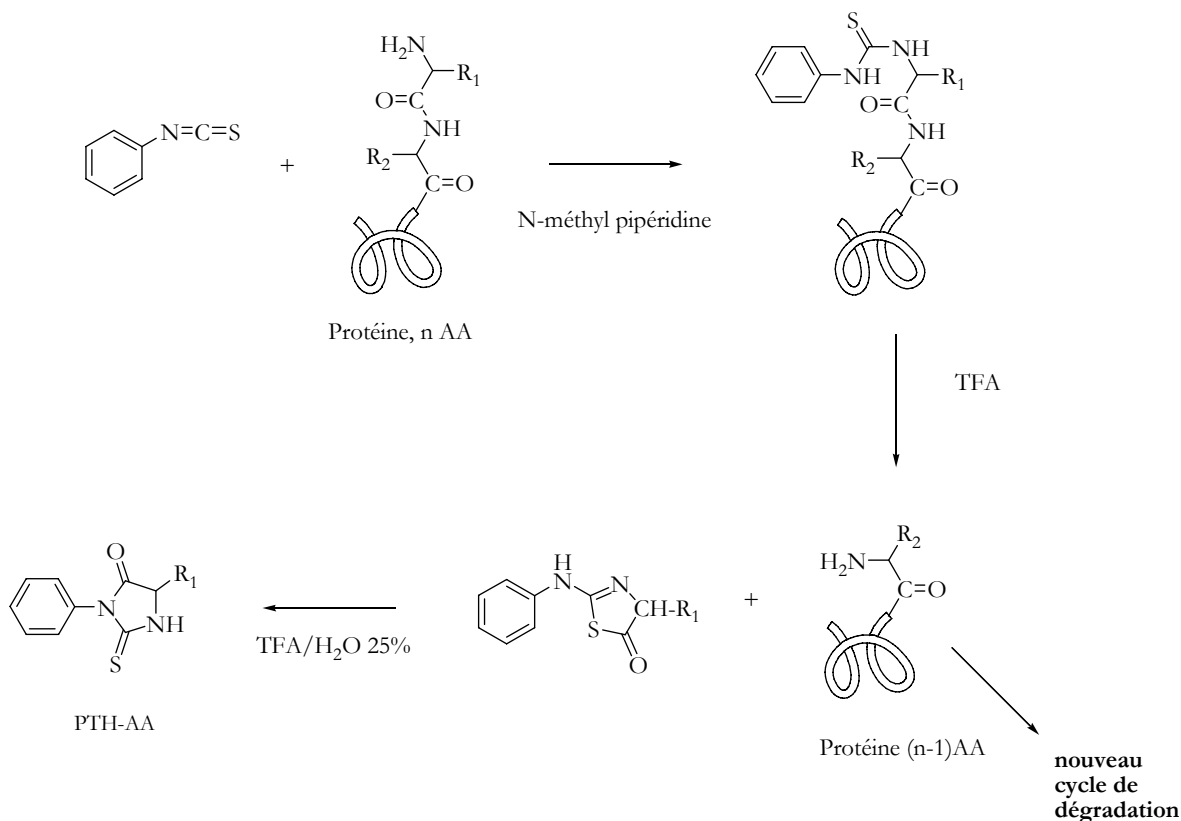


Figure V-3 : cycle de la dégradation d'Edman

Les dérivés d'acides aminés ainsi collectés sont ensuite analysés par scintillation liquide.

La solution radioactive est mélangée à un liquide scintillant, composé de diisopropylnaphthalène (solvant) et d'autres composés aromatiques fluorescents. Le rayonnement β^- de l'atome de tritium excite une molécule de solvant, qui émet un photon UV capté par une des molécules fluorescentes contenues dans le liquide scintillant, émettant dans le visible (400-500 nm). Les photons obtenus sont ensuite captés par un photomultiplicateur, qui va amplifier le signal et le convertir en signal électrique.

Les rayonnements ionisants émis suite aux désintégrations de l'atome radioactif sont ainsi transformés en un rayonnement lumineux détectable et quantifiable.

VI.9. Visualisation du marquage par β -imaging

La manipulation s'effectue en deux temps : en premier lieu, on prépare deux gels d'électrophorèse avec la protéine ou les peptides d'intérêt. Un des gels est ensuite révélé par du bleu de Coomassie, l'autre est utilisé pour l'imagerie radioactive. On transfère les macromolécules sur une membrane de PVDF, qui sera elle visualisée par β -imaging.

VI.9.1. Préparation des gels d'électrophorèse

On prépare le tampon de migration (10x) et le tampon dénaturant (1x)

<i>Migration</i>	<i>Dénaturation</i>	<i>Transfert</i>
- Tris 0.25M	- Solution Tris/glycine/SDS 0,1% 10x	- Solution Tris 25 mM
- Glycine 1,92M		- Glycine 192 mM
- HCl jusqu'à pH 8,3	- 10 mL SDS 10%	- MeOH (10%)
- H ₂ O milliQ	- H ₂ O milliQ	- H ₂ O milliQ

Tableau V-12 : préparation des tampons utilisés pour l'électrophorèse et le transfert sur membrane

✱ Gels SDS-PAGE :

	<i>Résolution (12,5%)</i>	<i>Concentration</i>
Acrylonitrile 40%	1,55 mL	330 μ L
H ₂ O	1,90 mL	1,38 mL
Tris	1,25 mL (1,5 M pH 8,8)	250 μ L (0,5M pH 6,8)
SDS 10%	40 μ L	20 μ L
APS 25%	40 μ L	20 μ L
TEMED	1,6 μ L	2 μ L

Tableau V-13 : préparation des gels utilisés pour l'électrophorèse (protéine)

✕ **Gels Tris-tricine :**

	<i>Résolution (16,5%)</i>	<i>Espaceur (10%)</i>	<i>Concentration (4%)</i>
Acrylonitrile 40%	2,5 mL	0,75 mL	200 µL
H ₂ O	0,5 mL	0,25 mL	0,8 mL
Tris (1,5M pH 8,8)	3,0 mL	2,00 mL	1,0 mL
SDS 10%	45 µL	20 µL	15 µL
APS 25%	10 µL	5 µL	10 µL
glycérol	640µL	-	-
TEMED	5 µL	5 µL	2 µL

Tableau V-14 : préparation des gels utilisés pour l'électrophorèse (peptides)

L'analyse des peptides s'effectue avec un gel beaucoup plus réticulé que pour la protéine selon la procédure décrite par Von Jagow et coll.³ On utilise un standard de poids moléculaires compris entre 1,6 kDa et 26 kDa pour le gel Tris-tricine.

Le tampon de migration utilisé (Tris/Tricine/SDS 0,1%) ainsi que le colorant (tricine + β -mercaptoéthanol 98/2) sont commerciaux.

Les échantillons sont dilués (1:3) avec du tampon Laemmli 95/ β -mercaptoéthanol 5, puis déposés dans les puits. Dans les puits externes, on mettra toujours les standards (échelle de poids moléculaires).

La tension appliquée est de 120 V pour la concentration, puis 180 V pour la migration. Les gels sont ensuite colorés au bleu de coomassie pendant deux heures, puis déteint en utilisant une solution MeOH 25%/H₂O 65%/AcOH 10% (deux heures – nuit entière).

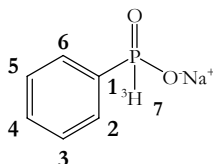
VI.9.2. Transfert sur membrane

La membrane en PVDF (poly-(difluorure de vinyle)) est plongée dans du méthanol pur pendant une minute puis rincée à l'eau. Le gel, deux feuilles de papier filtre et deux éponges sont laissés à incuber dix minutes dans le tampon de transfert. Le gel est ensuite mis en sandwich entre les feuilles d'éponge et de papier filtre puis appliqué contre la membrane. Le transfert peut ainsi débuter (2 h, 100 V). Après transfert, la membrane est séchée puis analysée au β -imager.

VII. Procédures expérimentales de chimie organique

VII.1. Synthèse et purification du sel sodique de l'acide phénylphosphinique tritié

VII.1.1. Synthèse et purification du composé fraîchement préparé



La synthèse est réalisée dans une boîte à gants en dépression renfermant un banc de tritiation, relié à une pompe à vide et comprenant des capteurs de pression permettant de déterminer la quantité de tritium injectée dans le système. Le tritium gaz est piégé sur un lit de La/Ni/Mn.

On réalise le montage suivant : on relie un bicol de 5 mL à un ballon de 5 mL *via* un tube en U lui-même connecté au banc de tritiation. La verrerie est séchée au décapeur thermique puis purgée à l'azote.

Dans le bicol est placé du dioxyde de platine anhydre (25 mg, 0,11 mmol). Dans le ballon, on verse du THF anhydre (2 mL), ainsi que de la poudre de LiAlH_4 . Après une heure sous agitation, on estime que le THF est suffisamment anhydre pour commencer la réduction. Le montage étant sous vide, on congèle le THF à l'azote liquide, puis on congèle le bicol contenant PtO_2 et on chauffe le ballon contenant le THF. Une fois qu'une partie du THF est transféré (1 mL), on remet le bicol sous vide et on le congèle. On introduit ensuite le tritium gaz (1 bar) pour effectuer l'oxydation de $^3\text{H}_2$ en $^3\text{H}_2\text{O}$. Après trente minutes, la dichlorophénylphosphine (7 μL , 52 μmol) est ajoutée, puis la solution est agitée pendant une heure. On réadsorbe ensuite le gaz tritium et met le montage sous azote. On ajoute ensuite Na_2CO_3 solide, puis une solution de NaHCO_3 pH 7,5. La solution est filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est ensuite dissous dans l'eau, puis évaporé (trois fois de suite pour éliminer les atomes de tritium échangeables).

La purification s'effectue par HPLC, selon les conditions suivantes :

- ➔ Colonne semi-préparative (Thermohypersil Keystone Hypurity C_{18} , 100 Å, 5 μm , 250×10 mm)
- ➔ Eluant : tampon phosphate 10 mM pH 7,2 en condition isocratique

- ➔ Débit 2 mL/min
- ➔ Détection conjointe UV à 248 nm et radioactive.

Après collecte du résidu ($t_R = 23,2$ min), la solution est évaporée, puis reprise dans du tampon phosphate 5 mM pH 7,2 (37 MBq/mL), et stockée à 4°C.

Formule brute : $C_6H_5^3HPO_2Na$

Masse molaire : 166,0 g.mol⁻¹

Rendement = 49 %

δ_H (ppm) dans D_2O : 7,45 [1H, d, PH, $^1J_{P-H} = 561$ Hz], 7,4-7,7 [5H, m, C(2-6)H]

δ_{3H} (ppm) dans D_2O : 7,54 [3H , d, P^3H , $^1J_{P-^3H} = 525$ Hz]

Activité spécifique : 144-481 GBq.mmol⁻¹

VII.1.2. Purification du composé radiolysé

Après séjour à 4°C, même à faible activité volumique, l'acide phénylphosphinique tritié se décompose. Il est donc nécessaire de le purifier.

La solution la plus simple est la purification HPLC par échange d'ions. La solution est analysée dans les conditions suivantes :

- ➔ Colonne analytique Hamilton PRP-X100 5 μ m 250mm \times 4,6mm
- ➔ Eluant : tampon K_2HPO_4 de concentration variable, CH_3CN à teneur variable.
- ➔ Gradient utilisé : de 0 à 15 minutes, K_2HPO_4 20 mM, CH_3CN 5% ; de 15 à 50 minutes, K_2HPO_4 20 mM, CH_3CN 10% ; de 50 à 70 minutes, K_2HPO_4 20 mM, CH_3CN 30%.
- ➔ Débit 1 mL/min
- ➔ Détection conjointe UV à 210nm et radioactive.

Les temps de rétention des produits radiolysés et du produit initial sont : $t_{R(rad1)} = 10,1$ min; $t_{R(rad2)} = 17,5$ min; $t_{R(rad3)} = 34,2$ min ; $t_{R(APP)} = 45,9$ min.

La méthode est ensuite transposée pour la purification :

- ➔ Colonne échangeuse d'anions semi-préparative Hamilton PRP-X100 10 μ m 250mm \times 10mm,
- ➔ Eluant : tampon K₂HPO₄ de concentration variable, CH₃CN à teneur variable.
- ➔ Gradient utilisé : de 0 à 15 minutes, K₂HPO₄ 20 mM, CH₃CN 5% ; de 15 à 40 minutes, K₂HPO₄ 20 mM, CH₃CN 10% ; de 40 à 70 minutes, K₂HPO₄ 20 mM, CH₃CN 30% ; 70 à 130 minutes, K₂HPO₄ 100 mM, CH₃CN 30%.
- ➔ Débit 2 mL/min
- ➔ Détection conjointe UV à 210nm et radioactive.

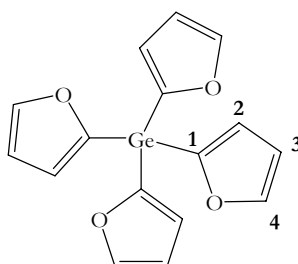
Les produits sont collectés en suivant en ligne les détections UV et radioactive, puis analysés sur colonne analytique en observant les temps de rétention.

Les solutions sont ensuite évaporées, puis dessalées sur colonne Hypersil C₁₈ 100Å, avec comme éluant du tampon phosphate pH 2 mM 7,2.

Les produits de radiolyse étant très peu retenus, cette méthode ne permet pas de dessaler entièrement l'échantillon.

VII.2. Synthèse de l'hydrure de trifurylgermane

Tétrafurylgermane



A une solution à 0°C de furane (2,14 mL, 29,33 mmol, 1,1 éq.) dans du THF anhydre (17 mL) est ajouté goutte à goutte du butyllithium (17 mL d'une solution 2,5M, 27,20 mmol, 1,0 éq.). La solution se colore immédiatement en jaune. Elle est ainsi laissée trente minutes à 0°C avant l'ajout de tétrachlorure de germanium (750 μ L, 6,14 mmol, 0,23 éq.). Le mélange est ensuite agité pendant trois heures. De l'eau (10 mL) est ajoutée à froid, puis la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle trois fois. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée,

évaporée puis purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant hexane/acétate d'éthyle 98:2).

Le produit obtenu est un solide blanc.

Formule brute : $C_{16}H_{12}GeO_4$

Masse molaire : 341,9 g.mol⁻¹

Rendement = 67%

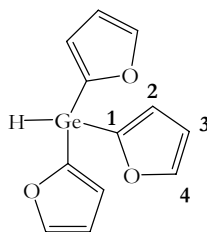
IR : ν_{\max} (KBr) cm⁻¹ 3145, 3122, 1549, 1453, 1360, 1207, 1150, 1104, 1006, 898, 748

δ_H (ppm) dans $CDCl_3$: 6,49 [4H, dd, 4×C(3)H, J=1,6 & 3,2 Hz], 6,88 [4H, d, 4×C(2)H, J=3,2 Hz], 7,76 [4H, d, 4×C(4)H, J=1,6 Hz]

δ_C (ppm) dans $CDCl_3$: 110,09 [C(2)], 122,28 [C(3)], 147,86 [C(4)], 150,86 [C(1)]

SM (GC/MS) : m/e: 342 ([M+H]⁺)

Hydrure de trifurylgermane



A une solution de tétrafurylgermane (500 mg, 1,49 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) sous argon est ajouté du lithium métal (32 mg, 4,51, 3,0 éq.). La solution blanchâtre prend une légère coloration jaune. La réaction est laissée deux heures à température ambiante.

De l'eau (5 mL) est ajoutée à froid, puis la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle trois fois. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, évaporée puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant pentane/éther 99:1).

Formule brute : $C_{12}H_{10}GeO_3$

Masse molaire : 276,0 g.mol⁻¹

Rendement = 40%

IR : ν_{\max} (KBr) cm⁻¹ 3142, 2089, 1639, 1550, 1454, 1360, 1206, 1151, 1102, 1004, 897, 744

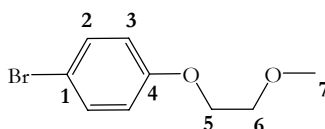
δ_H (ppm) dans CDCl₃ : 5,83 [1H, s, Ge-H], 6,50 [3H, dd, 3×C(3)H, J=1,6 & 3,2 Hz], 6,88 [3H, d, 3×C(2)H, J=3,2 Hz], 7,76 [3H, d, 3×C(4)H, J=1,6 Hz]

δ_C (ppm) dans CDCl₃ : 107,71 [C(2)], 119,60 [C(3)], 145,82 [C(4)], 148,46 [C(1)]

SM (ESI-TOF) : m/e : 204,90 [C₈H₇O₂⁶⁹Ge(-C₄H₃O)]⁺, 206,90 [C₈H₇O₂⁷¹Ge(-C₄H₃O)]⁺, 208,90 [C₈H₇O₂⁷³Ge(-C₄H₃O)]⁺

VII.3. Synthèse des hydrures d'étain

1-bromo-4-(2-méthoxyéthoxy)benzène⁴



Dans un bicol séché à l'étuve surmonté d'un réfrigérant, purgé à l'azote, sont placés du 4-bromophénol (533 mg, 3,08 mmol, 1 éq.), du carbonate de potassium anhydre (855 mg, 6,20 mmol, 2,1 éq.) et du 2-bromoéthyl méthyl éther en solution dans de l'acétone anhydre. Le mélange est chauffé pendant deux jours à 60°C.

La solution est évaporée sous vide, puis la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane trois fois. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée, évaporée puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant dichlorométhane/méthanol 99:1). On obtient une huile jaune pâle.

Formule brute : C₉H₁₁O₂Br

Masse : 230,0 g.mol⁻¹

Rendement= 74%

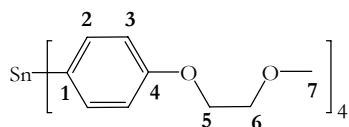
IR : ν_{\max} (NaCl) cm^{-1} 2927, 2880, 1591, 1579, 1489, 1453, 1286, 1247, 1129, 1062, 822

δ_{H} (ppm) dans CDCl_3 : 3,41 [3H, s, C(7)H₃], 3,70 [2H, t, C(6)H₂, J=4,6 Hz], 4,03 [2H, t, C(5)H₂, J=4,6 Hz], 6,78 [2H, d, C(3)H₂, J=8,9 Hz], 7,33 [2H, d, C(2)H₂, J=8,9 Hz]

δ_{C} (ppm) dans CDCl_3 : 59,37 [C(7)], 67,67 [C(5)], 71,04 [C(6)], 113,19 [C(1)], 116,62 [C(3)], 132,37 [C(2)], 158,08 [C(4)]

SM (ESI-TOF) : m/e : 252,93 [C₉H₁₁O₂⁷⁹Br+Na]⁺ et 254,92 [C₉H₁₁O₂⁸¹Br+Na]⁺

Tétra[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane



Dans un bicol séché au décapeur thermique puis purgé à l'azote surmonté d'un réfrigérant est placé du magnésium solide (252 mg, 10,4 mmol, 1,2 éq.) dans du THF anhydre (1 mL), ainsi qu'un cristal d'iode. On ajoute ensuite quelques gouttes de 1-bromo-4-(2-méthoxyéthoxy)-benzène fraîchement distillé. Une fois que la solution est devenue incolore, on ajoute le reste de dérivé bromé (2 g, 8,6 mmol, 1 éq.) en solution dans le THF (15 mL). Le mélange est chauffé pendant trois heures à reflux.

La solution marron est ensuite refroidie à température ambiante puis à -78°C . SnCl_4 (200 μL , 1,4 mmol, 0,16eq.) est ajouté goutte à goutte. On laisse le mélange revenir à température ambiante puis on le chauffe à reflux pendant la nuit.

On laisse le mélange revenir à température ambiante, puis on ajoute une solution de HCl 0,5 N. La phase aqueuse (HCl 0,5 N) est extraite à l'acétate d'éthyle trois fois. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, évaporée puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant hexane/acétate d'éthyle 4:6), permettant d'obtenir un solide blanc.

Formule brute : C₃₆H₄₄O₈Sn

Masse : 724,2 g.mol⁻¹

Rendement= 43%

IR : ν_{max} (KBr) cm^{-1} 2926, 2881, 1588, 1496, 1273, 1246, 1180, 1125, 1076, 923, 813

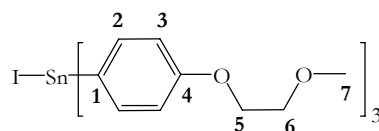
δ_{H} (ppm) dans CDCl_3 : 3,45 [12H, s, $4 \times \text{C}(7)\text{H}_3$], 3,75 [8H, t, $4 \times \text{C}(6)\text{H}_2$, $J=4,8$ Hz], 4,12 [8H, t, $4 \times \text{C}(5)\text{H}_2$, $J=4,8$ Hz], 6,91 [8H, d, $4 \times \text{C}(3)\text{H}_2$, $J=8,2$ Hz], 7,46 [8H, d, $4 \times \text{C}(2)\text{H}_2$, $J=8,2$ Hz, $^3J_{\text{Sn-H}}=38$ & 53 Hz]

δ_{C} (ppm) dans CDCl_3 : 59,30 [C(7)], 67,04 [C(5)], 71,08 [C(6)], 115,05 [C(3), $^3J_{\text{Sn-C}}=55$ Hz], 129,10 [C(1), $^1J_{\text{Sn-C}}=528$ & 552 Hz], 138,47 [C(2), $^2J_{\text{Sn-C}}=43$ Hz], 159,73 [C(4)]

δ_{Sn} (ppm) dans CDCl_3 : -115,52

SM (ESI-TOF) m/e : 572,95 [$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_6^{120}\text{Sn}(-\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2)]^+$

Iodotris[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane



Dans un bicol séché au décapeur thermique sous atmosphère d'azote est placé du tétra[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane (197 mg, 0,27 mmol, 1 éq.) en solution dans du dichlorométhane anhydre (2 mL). La solution est refroidie par un bain de glace. Une solution d' I_2 (68 mg, 0,27 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane (10mL) est ajoutée goutte à goutte à l'abri de la lumière. La solution est laissée sous agitation magnétique pendant quarante huit heures.

La solution jaune pâle est évaporée sous pression réduite puis purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant pentane/éther 4:6). On obtient une huile jaune pâle.

Formule brute : $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{IO}_6\text{Sn}$

Masse : 700,0 g.mol^{-1}

Rendement = 82%

IR : ν_{max} (KBr) cm^{-1} 2926, 2879, 1586, 1494, 1279, 1248, 1181, 1128, 1074, 812

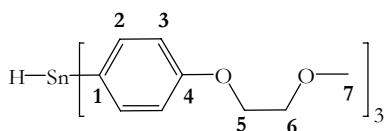
δ_H (ppm) dans $CDCl_3$: 3,44 [9H, s, $3 \times C(7)H_3$], 3,75 [6H, t, $3 \times C(6)H_2$, $J=4,8$ Hz], 4,12 [6H, t, $3 \times C(5)H_2$, $J=4,8$ Hz], 6,99 [6H, d, $3 \times C(3)H_2$, $J=8,4$ Hz], 7,53 [6H, d, $3 \times C(2)H_2$, $J=8,4$ Hz, $^3J_{Sn-H}=50$ & 65 Hz]

δ_C (ppm) dans $CDCl_3$: 59,18 [C(7)], 67,08 [C(5)], 70,85 [C(6)], 115,40 [C(3), $^3J_{Sn-C}=68$ Hz], 127,31 [C(1), $^1J_{Sn-C}=573$ & 661 Hz], 137,31 [C(2), $^2J_{Sn-C}=56$ Hz], 160,39 [C(4), $^4J_{Sn-C}=14$ Hz]

δ_{Sn} (ppm) dans $CDCl_3$: -101,72

SM (ESI-TOF) m/e : 569,01 [$C_{27}H_{33}O_6^{116}Sn(-I)^+$], 571,01 [$C_{27}H_{33}O_6^{118}Sn(-I)^+$], 573,00 [$C_{27}H_{33}O_6^{120}Sn(-I)^+$]

Tris[4-(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane



Dans un bicol séché au décapeur thermique sous atmosphère d'azote est placé de l'iodotris[4(2-méthoxyéthoxy)phényl]stannane (192 mg, 0,27 mmol, 1 éq.) en solution dans le DME anhydre (4 mL), à l'abri de la lumière. La solution est refroidie par un bain de glace. $NaBH_4$ (104 mg, 2,70 mmol, 10 éq.) est ajouté par petites quantités. La solution légèrement jaune se décolore immédiatement. Elle est laissée sous agitation magnétique pendant trois heures.

On ajoute de l'eau pour arrêter la réaction, puis la phase aqueuse (saumure) est extraite à l'éther trois fois. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, évaporée puis la solution est purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant pentane/éther 6:4), permettant d'obtenir une huile translucide.

Formule brute : $C_{27}H_{34}O_6Sn$

Masse : 574,1 g.mol⁻¹

Rendement = 62%

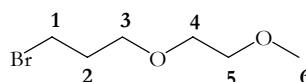
IR : ν_{max} (KBr) cm⁻¹ 2924, 2891, 1830(ν_{Sn-H}), 1587, 1495, 1276, 1247, 1183, 1127, 1076, 808

δ_H (ppm) dans C_6D_6 : 3,19 [9H, s, $3 \times C(7)H_3$], 3,48 [6H, t, $C(6)H_2$, $J=4,8$ Hz], 3,86 [6H, t, $C(5)H_2$, $J=4,8$ Hz], 7,01 [6H, d, $3 \times C(3)H_2$, $J=7,6$ Hz] 7,03 [1H, s, Sn-H, $^1J_{Sn-H}=1820$ & 1917 Hz], 7,60 [6H, d, $3 \times C(2)H_2$, $J=7,5$ Hz, $^3J_{Sn-H}=40$ & 56 Hz],

δ_C (ppm) dans C_6D_6 : 58,43 [C(7)], 66,90 [C(5)], 70,84 [C(6)], 115,31 [C(3), $^3J_{Sn-C}=65$ Hz], 128,26 [C(1), $^1J_{Sn-C}=528$ & 552 Hz], 138,60 [C(2), $^2J_{Sn-C}=45$ Hz], 160,14 [C(4), $^4J_{Sn-C}=12$ Hz]

SM (ESI-TOF) m/e : 568,98 [$C_{27}H_{33}O_6^{116}Sn(-H)^+$], 570,98 [$C_{27}H_{33}O_6^{118}Sn(-H)^+$], 572,98 [$C_{27}H_{33}O_6^{120}Sn(-H)^+$]

1-bromo-3-(2-méthoxyéthoxy)-propane



Dans un bicol est placé du 2-méthoxyéthanol (1 mL, 12,7 mmol, 1 éq.). De l'hydrure de sodium (506 mg (60% p/p), 12,7 mmol, 1 éq.), lavé au préalable trois fois dans l'éther anhydre, est ensuite ajouté en suspension dans le THF anhydre (3 mL) La solution est agitée pendant vingt minutes à froid, puis du 1,3-dibromopropane (2 mL, 17,6 mmol, 1,4 éq.) en solution dans le THF anhydre (3 mL) est ajouté goutte à goutte à froid.

La réaction est laissée pendant vingt quatre heures à température ambiante. Le solvant est évaporé sous flux d'azote. L'huile obtenue est ensuite purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant pentane/éther 9:1), permettant d'obtenir une huile translucide par évaporation des solvants au kügelrohr sous vide ($T^\circ C=50^\circ C$).

Formule brute : $C_6H_{13}O_2Br$

Masse : 196,0 g.mol⁻¹

Rendement= 15%

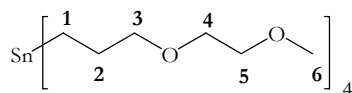
IR : ν_{max} (NaCl) cm⁻¹ 2876, 1455, 1359, 1286, 1257, 1199, 1115, 1028, 852

δ_H (ppm) dans $CDCl_3$: 2,12 [2H, q, $C(2)H_2$], 3,39 [3H, s, $C(6)H_3$], 3,51-3,59 [8H, m, $C(1)H_2$, $C(4)H_2$, $C(5)H_2$, $C(3)H_2$]

δ_c (ppm) dans CDCl_3 : 30,60 [C(1)], 32,67 [C(2)], 59,02 [C(6)], 68,63 [C(3)], 70,23 [C(4)], 71,81 [C(5)]

SM (ESI-TOF) : m/e : 196,96 $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2^{79}\text{Br} + \text{H}]^+$ et $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2^{81}\text{Br} + \text{H}]^+$

tétra[3-(2-méthoxyéthoxy)propyl]stannane



Dans un bicol séché au décapeur thermique puis purgé à l'azote surmonté d'un réfrigérant est placé du magnésium solide (74 mg, 3,05 mmol, 1,2 éq.) dans du THF anhydre (1 mL), ainsi qu'un cristal d'iode. On ajoute ensuite quelques gouttes de 1-bromo-3-(2-méthoxyéthoxy)-propane fraîchement distillé. Une fois que la solution est devenue incolore, on place le mélange à -15°C (éthanol/carboglance) on ajoute le reste de dérivé bromé (500 mg, 2,56 mmol, 1 éq.) en solution dans le THF (5 mL). Après une heure, quand tout le magnésium a été consommé, la solution blanchâtre est refroidie à -78°C . SnCl_4 (60 μL , 0,51 mmol, 0,20 éq.) est ajouté goutte à goutte. On laisse le mélange revenir à température ambiante puis on laisse sous agitation pendant vingt heures. On chauffe ensuite la solution verte pendant quatre heures au reflux du THF.

On laisse le mélange revenir à température ambiante, puis on ajoute une solution de HCl 0,5 N. La phase aqueuse HCl 0,5 N est extraite à l'éther trois fois. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, évaporée puis purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant pentane/éther 7:3), permettant l'obtention d'une huile translucide.

Formule brute : $\text{C}_{24}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{Sn}$

Masse : 588,3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement = 27%

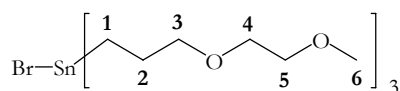
IR : ν_{max} (NaCl) cm^{-1} 2861, 1454, 1356, 1286, 1199, 1112, 1034, 848

δ_H (ppm) dans CDCl_3 : 0,74 [8H, t, $4\times\text{C}(1)\text{H}_2$, $^2J_{\text{Sn-H}} = 50$ Hz], 1,74 [8H, q, $4\times\text{C}(2)\text{H}_2$, $^3J_{\text{Sn-H}} = 58$ Hz], 3,37 [8H, t, $4\times\text{C}(3)\text{H}_2$], 3,39 [12H, s, $4\times\text{C}(6)\text{H}_3$], 3,54 [16H, m (AA'BB'), $4\times\text{C}(4)\text{H}_2$ & $4\times\text{C}(5)\text{H}_2$]

δ_c (ppm) dans $CDCl_3$: 4,41 [C(1), $^1J_{Sn-C}$ = 307 & 321 Hz], 26,66 [C(2), $^2J_{Sn-C}$ = 18 & 31 Hz], 59,98 [C(6)], 69,96 [C(4)], 71,78 [C(5)], 74,79 [C(3), $^3J_{Sn-C}$ = 66 Hz]

SM (ESI-TOF) : m/e : 607,12 [$C_{24}H_{52}O_8^{116}Sn+Na$] et 609,11 [$C_{24}H_{52}O_8^{118}Sn+Na$]

Bromotris[3-(2-méthoxyéthoxy)propyl]stannane



Dans un bicol séché au décapeur thermique sous atmosphère d'azote est placé du tétra[3-(2-méthoxy-éthoxy)propyl]stannane (60 mg, 0,10 mmol, 1 éq.) en solution dans du dichlorométhane anhydre (2 mL). La solution est refroidie à $-50^\circ C$. Une solution 1 M de Br_2 (100 μL , 0,10 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane est ajoutée goutte à goutte à l'abri de la lumière. La solution est laissée sous agitation magnétique pendant vingt quatre heures après retour à température ambiante.

La solution rouge foncée est évaporée sous pression réduite puis purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant pentane/éther 3:7). On obtient une huile claire translucide que l'on stocke au congélateur sous Argon.

Formule brute : $C_{18}H_{39}BrO_6Sn$

Masse : 598,1 $g \cdot mol^{-1}$

Rendement = 32%

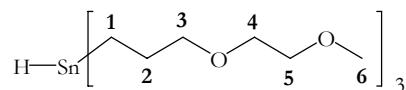
IR : ν_{max} (NaCl) cm^{-1} 2918, 2871, 1454, 1358, 1199, 1096, 1040, 845

δ_H (ppm) dans $CDCl_3$: 1,34 [6H, t, $3 \times C(1)H_2$], 1,97 [6H, t, $3 \times C(2)H_2$], 3,37 [9H, s, $3 \times C(6)H_3$], 3,50 [6H, t, $3 \times C(3)H_2$], 3,53-3,61 [$2 \times 6H$, m (AA'BB'), $3 \times C(4)H_2$ & $3 \times C(5)H_2$]

δ_c (ppm) dans $CDCl_3$: 15, 01 [C(1), $^1J_{Sn-C}$ = 399 & 414 Hz], 26,08 [C(2)], 59,96 [C(6)], 70,00 [C(4)], 71,75 [C(5)], 73,46 [C(3), $^3J_{Sn-C}$ = 65 Hz]

SM (ESI-TOF) : m/e : 467,07 [$C_{18}H_{39}O_6^{116}Sn(-Br)^+$], 469,07 [$C_{18}H_{39}O_6^{118}Sn(-Br)^+$], 471,07 [$C_{18}H_{39}O_6^{120}Sn(-Br)^+$]

Tris[3-(2-méthoxyéthoxy)propyl]stannane



Dans un bicol séché au décapeur thermique sous atmosphère d'azote est placé du bromotris[3-(2-méthoxyéthoxy)propyl]stannane (21 mg, 0,038 mmol, 1 éq.) en solution dans le DME anhydre (1 mL), à l'abri de la lumière. La solution est refroidie par un bain de glace. NaBH₄ (16,7 mg, 0,44 mmol, 10 éq.) est ajouté par petites quantités. La solution légèrement jaune se décolore immédiatement. Elle est laissée sous agitation magnétique pendant trois heures.

La solution est filtrée sur célite, puis on rince à l'éther. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée, évaporée puis purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant pentane/éther 1/9), permettant d'obtenir une huile translucide que l'on stocke à -20°C sous argon.

Formule brute : C₁₈H₄₀O₆Sn

Masse : 472,2 g.mol⁻¹

Rendement = 84%

IR : ν_{\max} (NaCl) cm⁻¹ 2920, 2881, 1820($\nu_{\text{Sn-H}}$), 1454, 1357, 1299, 1249, 1196, 1140, 1040, 845

δ_{H} (ppm) dans CDCl₃ : 0,95 [6H, td, 3×C(1)H₂], 1,87 [6H, q, 3×C(2)H₂], 3,17 [9H, s, 3×C(6)H₃], 3,35 [6H, t, 3×C(3)H₂], 3,48-3,58 [2×6H, m (AA'BB'), 3×C(4)H₂ & 3×C(5)H₂], 5,15 [1H, septet (J=1,7 Hz), Sn-H, ¹J_{Sn-H} = 1614 Hz]

δ_{C} (ppm) dans CDCl₃ : 4,85 [C(1), ¹J_{Sn-C} = 334 & 352 Hz], 27,45 [C(2), ²J_{Sn-C} = 22 Hz], 58,28 [C(6)], 69,98 [C(4)], 71,95 [C(5)], 74,05 [C(3), ³J_{Sn-C} = 52 Hz]

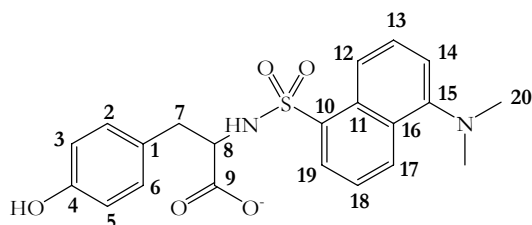
SM (ESI-TOF) : m/e : 467,06 [C₁₈H₃₉O₆¹¹⁶Sn(-H)]⁺, 469,06 [C₁₈H₃₉O₆¹¹⁸Sn(-H)]⁺, 471,06 [C₁₈H₃₉O₆¹²⁰Sn(-H)]⁺

VII.4. Synthèse des composés dansylés

Seuls les dérivés dansylés de la tyrosine et du *p*-crésol ont été synthétisés sur de

grande quantité, afin de vérifier la nature du composé obtenu par spectrométrie de masse et RMN ^1H .

Tyrosine dansylée



A 35 mg (0,193 mmol) de tyrosine dissoute dans 15 mL de tampon NaHCO_3 0,5 M sont ajoutés 200 mg (0,743 mmol, 3,9 eq.) de chlorure de dansyle dans l'acétone (17 mL). La réaction est laissée sous agitation à 37°C pendant trois heures. La solution est ensuite extraite au dichlorométhane/acide formique 10%. La solution organique est évaporée, puis le résidu est repris dans un mélange méthanol/eau 50/50, puis la purification est effectuée par HPLC préparative ($t_R = 18,2$ min).

Conditions de purification par HPLC :

- ➔ Colonne préparative Waters Atlantis 5 μm 150mm \times 19mm,
- ➔ Eluant A: HCO_2H 0,1%; éluant B: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCO}_2\text{H}$ 0,1%;
- ➔ Gradient HPLC utilisé : 5 à 60%B en 30 min, 60% à 100%B en 40 min
- ➔ Débit 5 mL/min
- ➔ Détection UV (barrette de diodes)

Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$

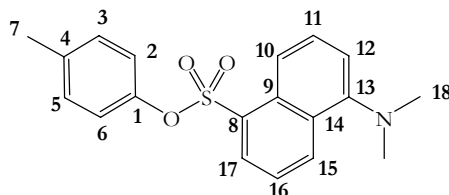
Masse : 414,1 g.mol $^{-1}$

Rendement = 33%

δ_H (ppm) dans CDCl_3 ; 2,74 [1H, dd, $J=8,8$ & 14,0 Hz, C(7)H], 2,84 [1H, dd, $J=6,1$ & 14,0 Hz, C(7)H], 3,65 [1H, dd, $J=6,1$ & 8,8 Hz, C(8)H], 6,39 [2H, d, C(3)&C(5)H, $J=8,0$ Hz], 6,68 [2H, d, C(2)&C(6)H $_2$, $J=8,0$ Hz], 7,10 [1H, d, C(14)H, $J=7,6$ Hz], 7,38 [1H, t, C(13)H, $J=12,8$ Hz], 7,42 [1H, t, C(18)H, $J=12,8$ Hz], 8,03 [1H, d, C(12)H, $J=7,2$ Hz], 8,08 [1H, d, C(17)H, $J=8,8$ Hz], 8,42 [1H, d, C(19)H, $J=8,4$ Hz]

SM (LC/ESI-MS) m/e : 415 [C₂₁H₂₃N₂O₅S+H]⁺

Crésol dansylé



A 12,1 mg (0,112 mmol) de *p*-crésol dissous dans 5 mL de tampon K₂CO₃ 0,5 M sont ajoutés 60 mg (0,223 mmol, 1,8 eq.) de chlorure de dansyle dans l'acétone (6 mL). La réaction est laissée sous agitation à 37°C pendant trois heures. La solution est ensuite extraite au dichlorométhane/acide formique 10%. La solution organique est évaporée, puis le résidu est repris dans un mélange méthanol/eau 50/50, puis la purification est effectuée par HPLC préparative.

Conditions de purification par HPLC :

- ➔ Colonne préparative Waters Atlantis 5 µm 150mm×19mm,
- ➔ Eluant A: HCO₂H 0,1%; éluant B: CH₃CN/HCO₂H 0,1%;
- ➔ Gradient HPLC utilisé : 5 à 100%B en 20 min, puis 100%B en 40 min
- ➔ Débit 5 mL/min
- ➔ Détection UV (barrette de diodes)

Formule brute : C₁₉H₁₉NO₃S

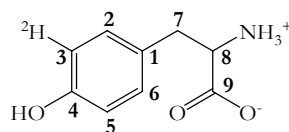
Masse : 341,1 g.mol⁻¹

Rendement= 19%

δ_H(ppm) dans CDCl₃ : 2,23 [3H, s, C(7)H₃], 2,92 [6H, s, 2×C(18)H₃], 6,75 [2H, d, C(2)&C(6)H, J =8,4 Hz], 6,96 [2H, d, C(3)&C(5)H, J =8,4 Hz], 7,26 [1H, d, C(12)H, J =7,3 Hz], 7,44 [1H, dd, C(11)H, J =7,5 Hz & 8,4Hz], 7,67 [1H, dd, C(16)H, J =8,5Hz], 8,06 [1H, dd, C(10)H, J =7,3 Hz & 8,5Hz], 8,49 [1H, d, C(15)H, J =8,5Hz], 8,59 [1H, d, C(17)H, J =8,5Hz]

SM (LC/ESI-MS) : m/e : 342 [C₁₉H₂₀NO₃S +H]⁺

VII.5. Synthèse de la tyrosine monodeutérée



Dans un bicol de 50 mL on place de la 3-iodo-tyrosine (50 mg, 0,15 mmol, 1 éq.), du palladium sur charbon (15 mg), du méthanolate de sodium (2 éq.) et du méthanol (5 mL). La solution est dégazée par “freeze and thaw” trois fois de suite avec purge à l’azote. Du deutérium gaz est ensuite introduit dans le ballon. La réaction est laissée sous agitation pendant une heure trente à température ambiante.

La suspension est ensuite filtrée sur filtre Millipore (HMPV), la solution est évaporée sous pression réduite. On ajoute une solution d’HCl 5N jusqu’à obtenir un pH de 5,5, laisse précipiter la tyrosine, puis on filtre. Le solide blanc obtenu est ensuite séché sous vide.

Formule brute : $C_9H_{10}^2HNO_3$

Masse : 182,1 g.mol⁻¹

Rendement= 65%

δ_H (ppm) dans D_2O : 2,63 [1H, dd, J=7,4 & 13,7 Hz, C(7)H], 2,82 [1H, dd, J=5,2 & 13,7 Hz, C(7)H], 3,37 [1H, dd, J=5,2 & 7,5 Hz, C(8)H], 6,55 [1H, d+s, C(5)&C(3)H], 6,96 [2H, m, C(2)&C(6)H₂]

δ_C (ppm) dans D_2O : 39,8 [C(7)], 57,5 [C(8)], 118,6 [t+s, C(3)&C(5)H], 123,7 [C(1)], 130, 6 & 130, 7 [C(2)&C(6)], 164,4 [C(4)], 183,0 [C(9)]

SM (LC/ESI-MS): m/e: 415,1 [C₂₁H₂₂²H N₂O₅S+H]⁺ (tyrosine-*d1* dansylée)

Incorporation isotopique : 97% (via le composé dansylé)

VIII. Procédures expérimentales des expériences de radiolyse

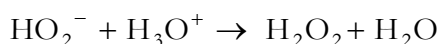
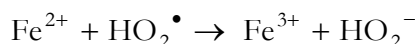
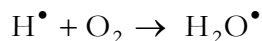
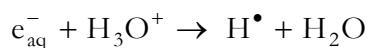
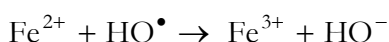
VIII.1. Génération des radicaux

La méthode de création des radicaux hydroxyle utilisés pour induire la formation de

radicaux sur les acides aminés est la radiolyse de l'eau par des rayons γ .

L'irradiation est conduite en utilisant une source de ^{137}Cs (installation IBL637, Institut Curie, université d'Orsay) délivrant une dose de 38 Gy/min, déterminée par dosimétrie de Fricke, reposant sur l'oxydation d'une solution aérée de sulfate ferreux par les espèces créées par la radiolyse de l'eau.

La mesure du débit de dose a été réalisée en doublon par Sophie Le Caer, du laboratoire de radiolyse (CEA/Saclay/DSM/DRECAM). Expérimentalement, cela consiste à préparer une solution contenant du sel de Mohr $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ à 1 mM, H_2SO_4 à 0,4 M, et NaCl 1 mM. Toutes les espèces formées par radiolyse de l'eau vont oxyder les ions ferreux en ions ferriques.



Équations V-1 : Réactions intervenant lors de la dosimétrie de Fricke

Mesurer l'absorbance en ions ferriques permet de connaître la dose délivrée (en Gy) et donc de déduire le débit de dose (Gy/min) grâce à la relation :

$$\text{Dose (Gy)} = \frac{\mathcal{N}_a \times A_{304} \times 100}{\varepsilon \times 10^3 \times G_{(\text{Fe}^{3+})} \times f \times \rho \times l}$$

Équation V-2 : relation entre dose déposée et absorbance mesurée

Où :

\mathcal{N}_a = nombre d'Avogadro = $6,02 \times 10^{23}$ molécules/mole

A_{304} = absorbance de Fe^{3+} à 304 nm

ε = coefficient d'extinction molaire de Fe^{3+} à 304 nm ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) = $2212 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 26°C

$G_{(\text{Fe}^{3+})}$ = rendement en Fe^{3+} (molécules/100 eV) = 15,3 molécules/100 eV pour les photons γ du ^{137}Cs

f = $6,24 \times 10^{15}$ eV/Gy

ρ = densité de la solution irradiée = 1,024 pour une solution 0,4 M en H_2SO_4

l = longueur du chemin optique en cm

L'utilisation de N_2O permet de doubler la quantité de radicaux hydroxyle créés en convertissant les électrons aqueux en HO^\bullet .

Le temps d'irradiation est donné par :

$$t(\text{min}) = \frac{[OH^\bullet](\text{mM})}{\text{Dose}(\text{Gy} \cdot \text{min}^{-1}) \times G_{(OH^\bullet)}(\text{mmol} \cdot \text{J}^{-1}) \times 1,04 \times 10^{-4}}$$

Equation 1 : relation liant $[HO^\bullet]$ et temps d'irradiation

Avec : Dose = 38 Gy.min⁻¹ et $G_{(OH^\bullet)} = 5,6 \text{ mmol} \cdot \text{J}^{-1}$

VIII.2. Mise au point des conditions d'analyse de la dégradation et de l'incorporation

VIII.2.1. Mise au point des conditions analytiques pour l'étude de la dégradation de la tyrosine

La tyrosine et la 3,4-DOPA sont disponibles commercialement. En revanche, la dityrosine doit être préparée au laboratoire.

Plusieurs tentatives de synthèse de la dityrosine ont été essayées, soit par irradiation de la tyrosine en tampon alcalin,⁵ soit par oxydation.^{6,7} Cependant, les résultats n'ont pas été satisfaisants, et manquant de temps, nous n'avons pas pu améliorer cette préparation.

On prépare des solutions mères de tyrosine (1,497 mM) et de 3,4-DOPA (2 mM) avec une solution d'HCl 10⁻² N. Ensuite diverses injections de cette solution sont réalisées en HPLC, sur colonne analytique pour tracer la courbe étalon (Tableau V-15).

Le système d'éluants utilisé est A = HCl pH 2,6, B=CH₃CN, sur une colonne analytique Phenomenex Luna C₁₈(2) 5 µm 100 Å, 4,6 mm×25 mm.

<i>Entrée</i>	<i>Composé étudié</i>	<i>Gradient</i>	<i>t_r (min)</i>	<i>Pente de Aire = f(n)</i>
1	tyrosine	0→1%B en 10 min,	8,0	73 652
2	3,4-DOPA	1%→10%B en 12,5 min,	5,1	154 617
3	dityrosine	10%→100%B en 17 min	11,0	nd

Tableau V-15 : détermination du temps de rétention et de la loi donnant l'aire du pic sur le chromatogramme en fonction de la quantité injectée pour la tyrosine

Le temps de rétention dans ces conditions d'analyse est de $t_R=9,8$ min. La 3,4-DOPA n'est quasiment pas retenue ($t_R = 5,1$ min), Figure V-4.

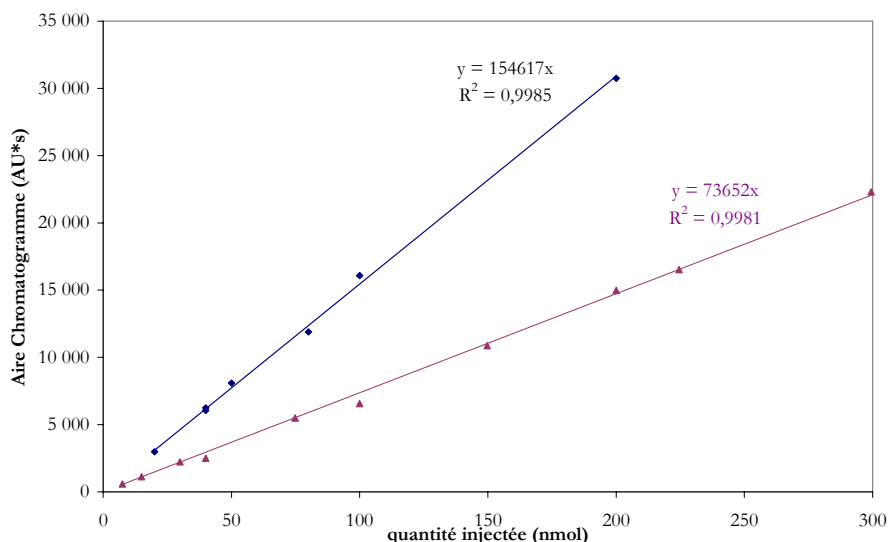


Figure V-4 : courbe étalon donnant la quantité de tyrosine injectée selon l'aire du chromatogramme observée

VIII.2.2. Mise au point des conditions analytiques pour l'étude de la tyrosine dansylée

VIII.2.2.a. Synthèse de la tyrosine dansylée

A 200 nmol de tyrosine sont ajoutés :

- ➔ 150 μ L de tampon NaHCO_3 0,5 M
- ➔ 40 μ L de solution de DNS-Cl 40 mM dans l'acétone

La solution est laissée pendant une heure à 37°C, puis évaporée à sec. Le résidu est ensuite extrait avec un mélange $\text{EtOAc}/\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}_2\text{H}$ 10% (3×400 μ L). La phase organique est ensuite évaporée sous pression réduite, et conservée à -20°C jusqu'à purification par HPLC.

VIII.2.2.b. Purification des échantillons par HPLC phase inverse

Le résidu est repris par $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 9/1 (220 μ L), puis injecté (200 μ L) en HPLC.

- ➔ Colonne analytique Phenomenex Luna $\text{C}_{18}(2)$ 5 μm 100 Å, 4,6 mm \times 25 mm
- ➔ Eluant A: NH_4HCO_3 100 mM/ CH_3CN 9/1 ; éluant B = NH_4HCO_3 100 mM/ CH_3CN 55/45
- ➔ Gradient HPLC utilisé : 5 \rightarrow 77%B en 17 minutes, puis 100%B en 20 minutes

➔ Débit 1 mL/min

Après collecte du résidu dansylé, ($t_R=21,5$ min), la solution est évaporée puis stockée à -20°C jusqu'à l'analyse LC-MS.

VIII.2.3. Analyse par spectrométrie de masse

Pour la tyrosine dansylée, l'abondance isotopique naturelle est calculée en tenant compte de l'abondance naturelle de chacun des isotopes présents dans la molécule (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{33}S , etc.). La formule brute de la DNS-Y est $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$, soit une masse exacte de 414,1 g.mol⁻¹. Les abondances isotopiques naturelles sont données dans le Tableau III-5 :

m/e	414,1	415,1	416,1	417,1
Abondance relative (%)	100%	25,4%	8,5%	1,6%

Tableau V-16 : abondance isotopique naturelle de la tyrosine dansylée

On regarde la monodeutération de la tyrosine dansylée, i.e. l'augmentation du signal de la masse à 415. L'écart au théorique est en moyenne de 1% (Tableau III-6).

Entrée	Nombre d'injections	Abondance naturelle moyenne (%)
1	3	24,6% \pm 0,2%
2	4	24,4% \pm 0,1%
3	9	24,4% \pm 0,1%
4	3	24,3% \pm 0,3%

Tableau V-17 : mesure de l'abondance isotopique naturelle par LC-MS

VIII.2.4. Mise au point des méthodes d'analyse d'analogues de la tyrosine

VIII.2.4.a. Quantification et dégradation

On utilise les solutions préparées lors de l'irradiation pour limiter l'imprécision sur les mesures. Le système d'éluants utilisé est A = HCl pH 2,6, B=CH₃CN, sur une colonne Phenomenex Luna C₁₈(2) 5 μm 100 Å. On effectue plusieurs injections de deux solutions différentes, puis la droite donnant l'aire du pic du chromatogramme en fonction de la quantité injectée est tracée. Les résultats sont regroupés dans le Tableau V-18.

Entrée	Composé étudié	Gradient	t_R (min)	Pente de Aire = $f(n)$
1	Tyrosine O-méthylée	0→10%B en 10 min,	18,3	73 652
		10%→20%B en 20 min		
		20%→100%B en 25 min		
2	<i>p</i> -crésol	0→1%B en 10 min,	25,6	95 549
		1%→10%B en 12,5 min		
		10%→50%B en 22,5 min		
3	<i>N</i> -acétyl-tyrosinamide	50%→100%B en 32,5 min	18,5	83 938
		0%→10%B en 10 min,		
		10%→30%B en 20 min		
		30%→100%B en 25 min		

Tableau V-18 : détermination du temps de rétention et de la pente donnant l'aire du pic du chromatogramme en fonction de la quantité injectée pour OMT, *p*-crésol, *N*-acétyl-tyrosinamide

L'analyse de la dégradation s'effectue en injectant un dixième de la solution irradiée (soit 20 nmol initiales) selon le même gradient. On déduit du profil du chromatogramme la quantité restante de O-méthyl tyrosine ainsi que certains produits formés comme la tyrosine.

VIII.2.4.b. Dansylation et purification des analogues

La dansylation de la tyrosine O-méthylée s'effectue dans les mêmes conditions que pour la tyrosine. Celle du *p*-crésol s'effectue sur le phénol, c'est pourquoi il faut se placer dans des conditions plus basiques que lors de la dansylation de la tyrosine sur l'azote. Le pKa du *p*-crésol étant de 10,17, on effectue la réaction de couplage à pH 12 avec K₂CO₃ 0,5 M. NAYA n'est pas dansylé. Il est donc purifié directement en utilisant le gradient du Tableau V-18, entrée 3.

A 200 nmol de O-méthyl tyrosine/crésol sont ajoutés

- ➔ 150 µL de tampon NaHCO₃ 0,5 M (OMT), K₂CO₃ 0,5 M pour le crésol
- ➔ 40 µL de solution de DNS-Cl 40 mM dans l'acétone

La solution est laissée pendant une heure à 37°C, puis évaporée à sec. Le résidu est ensuite extrait avec un mélange EtOAc/H₂O-HCO₂H 10% (3×400 µL). La phase organique est ensuite évaporée sous pression réduite, et conservée à -20°C jusqu'à purification par HPLC.

Quel que soit le composé purifié, la colonne utilisée est une colonne analytique

Phenomenex Luna C₁₈ 5 µm 100 Å, 250 mm×4,6 mm. Les conditions HPLC sont données par le Tableau V-19.

Entrée	Composé étudié	Gradient	t_r (min)
1	Tyrosine O-méthylée	5→90%B en 20 min,	23,1
		90%→94%B en 20 min	
		94%→100%B en 26 min	
2	<i>p</i> -crésol	5→77%B en 17 min,	22,5
		77%→100%B en 20 min	
		100%B en 35 min	

Tableau V-19 : détermination du temps de rétention pour DNS-OMT et DNS-crésol

VIII.2.4.c. Analyse par spectrométrie de masse des analogues

VIII.2.4.c.1. O-méthyl tyrosine

La mise au point de la détermination de l'incorporation isotopique par spectrométrie de masse s'effectue comme pour la tyrosine dansylée avec l'injection systématique d'un témoin au moins trois fois lors de plusieurs séries d'expériences. La formule brute de la tyrosine O-méthylée dansylée est C₂₂H₂₄N₂O₅S, la masse exacte est de 428,1 g.mol⁻¹, et l'abondance des satellites est donnée dans le Tableau V-20.

m/e	428,1	429,1	430,1	431,1
Abondance relative (%)	100%	26,6%	8,7%	1,5%

Tableau V-20 : abondance isotopique naturelle de la tyrosine O-méthylée dansylée

Les résultats obtenus sur trois séries sont décrits dans le Tableau V-21. On retrouve l'écart au théorique supérieur à 1%.

Entrée	Nombre d'injections	Abondance naturelle moyenne (%)
1	3	25,2% ± 0,2%
2	8	25,3% ± 0,1%
3	3	25,0% ± 0,4%

Tableau V-21 : mesure de l'abondance isotopique naturelle par LC-MS de OMT dansylée.

VIII.2.4.c.2. *p*-crésol

La formule brute du *p*-crésol dansylé est C₁₉H₁₉NO₃S, la masse exacte est de 341,1

g.mol⁻¹, et l'abondance des satellites est donnée dans le Tableau V-22.

m/e	341,1	342,1	343,1	344,1
Abondance relative (%)	100%	22,7%	7,5%	1,3%

Tableau V-22 : abondance isotopique naturelle du p-crésol dansylé

Les résultats obtenus sur trois séries de quatre injections chacune donnent une abondance naturelle moyenne de 22,1% \pm 0,2%. On observe une déviation au théorique de 0,6%.

VIII.2.4.c.3. N-acétyl-tyrosinamide

En injectant directement le composé commercial, on note que le temps de rétention est satisfaisant, i.e. qu'il est suffisamment retenu pour pouvoir être analysé seul. C'est pourquoi on n'effectue pas de dansylation sur ce composé. Il suffit juste de purifier au préalable le composé selon le gradient utilisé pour l'analyse de dégradation.

La formule brute de N-acétyl-tyrosinamide est C₁₁H₁₄N₂O₃, la masse exacte est de 222,1 g.mol⁻¹, et l'abondance des satellites est donnée dans le Tableau V-23. La présence d'un fragment (-NH₃⁺) en plus du produit ne vient pas contrarier les résultats.

m/e	222,1	223,1	224,1
Abondance relative (%)	100%	13,3%	1,4%

Tableau V-23 : abondance isotopique naturelle du N-acétyl-tyrosinamide

L'abondance naturelle moyenne obtenue sur trois séries de deux injections est égale à 12,9% \pm 0,1%. On observe une déviation au théorique de 0,4%.

VIII.3. Expérience de radiolyse

VIII.3.1. Préparation des échantillons

On utilise de la verrerie séchée au décapeur thermique puis à l'étuve pour la préparation des solutions. Pour les expériences analysées par spectrométrie de masse, les échantillons sont préparés dans des flacons de 4 mL en verre scellés par septum en silicone/PTFE. Pour l'analyse par RMN, les flacons pour l'irradiation sont des flacons à vis de 50 mL ou des erlenmeyers fermés par un septum.

Les solutions mères de tampon phosphate dans D₂O (100 mM pD=7,2 (pD=pH mesuré +0,4)⁸), L-tyrosine (2 mM, tampon Pi 10 mM) sont préparées par pesée précise et mesure précise du volume (fiolle jaugée ou micropipettes).

Pour l'étude par spectrométrie de masse, les solutions à irradier ont typiquement des concentrations en acide aminé de 100 μM et sont tamponnées par le tampon phosphate 10 mM à pD 7,2. La dose appliquée varie telle que la concentration en radicaux $\cdot\text{OH}$ soit comprise entre 50 et 500 μM . Les solutions de 2 mL (SM) sont dégazées pendant 1 h avec N_2O à température ambiante, puis irradiées pendant le temps nécessaire à l'obtention de la bonne quantité de radicaux hydroxyle.

Pour les expériences de RMN, la concentration en tyrosine peut varier, selon le volume, de 400 μM à 2 mM. Les solutions de 25 mL sont dégazées pendant deux heures trente avec N_2O à température ambiante puis irradiées pendant le temps nécessaire à l'obtention de la bonne quantité de radicaux hydroxyle.

VIII.3.1.a. Expériences à concentration croissante en HO

La préparation des échantillons consiste en la préparation d'une solution mère de tyrosine dans D_2O à 2 mM, ainsi qu'une solution mère de tampon phosphate à 200 mM pD 7,2.

Pour les échantillons étudiés après irradiation par spectrométrie de masse, les volumes des solutions à irradier sont de 2 mL. Les solutions mères sont diluées pour obtenir une concentration finale en tyrosine de 100 μM et une concentration en tampon soit nulle, soit égale à 100 mM.

Pour la RMN est préparée une solution de 25 mL contenant :

- 400 – 800 μM Y
- 0 – 100 mM Tampon Pi p²H 7,2
- qsp d'eau lourde

Les échantillons sont ensuite dégazés avec N_2O le temps adéquat.

VIII.3.1.b. Expériences pH-dépendantes

On prépare trois solutions à 200 mM de chacune des espèces dans D_2O , puis par mélange approprié des couples acido-basiques ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) on obtient des solutions tampons à 0,2 M au pH voulu. Pour les tampons de p²H > 11, on ajuste avec NaOD.

Ensuite on prépare les échantillons de 2 mL avec 1 mL de solution tampon, soit une concentration finale de 100 mM idéale pour conserver constant le pH durant l'irradiation, et une concentration finale en Y de 100 μM .

Pour les échantillons de RMN, une solution de 25 mL est préparée contenant 800 μM

en Y, 100 mM en Tampon Pi et qsp d'eau lourde.

VIII.3.1.c. Autres expériences

Pour les autres expériences, on ajoute en plus de la tyrosine et du tampon d'autres composés chimiques tels que KBr, NaHCO₂, DTT, etc. de telle sorte que leur concentration finale soit 100mM pour le KBr, 100 mM pour le formiate de sodium, et les concentrations indiquées pour le DTT et les autres vecteurs, quels que soient les volumes utilisés.

VIII.3.2. Traitement des échantillons

VIII.3.2.a. Analyse de la dégradation

Après l'irradiation, un dixième de la solution irradiée (100 µL, 20 nmol initiales) est injecté en HPLC pour déterminer le taux de dégradation de la tyrosine ou des analogues, ainsi que les produits secondaires formés.

VIII.3.2.b. Traitement et purification des échantillons

VIII.3.2.b.1. Analyse par spectrométrie de masse uniquement

Après irradiation, le p²H de chaque solution est mesuré. Ensuite, les échantillons sont évaporés à sec, sauf pour le *p*-crésol, volatil, qui est directement dansylé.

La totalité des échantillons est ensuite dansylée suivant le protocole standard, puis purifiée par HPLC.

VIII.3.2.b.2. Analyse par RMN

Après irradiation, le pH de chaque solution est mesuré. Ensuite, les échantillons sont évaporés à sec, sauf pour le *p*-crésol. Les signaux RMN du groupement dansyle et du crésol ne se superposant pas, la dérivation ne présente pas de problème pour l'analyse par RMN. C'est pourquoi le crésol est immédiatement dansylé après irradiation. Les conditions de réaction n'entraînent pas de modification de l'incorporation.

Une partie (200 - 400 nmol) de chaque échantillon est ensuite dansylée afin de déterminer le taux d'incorporation en deutérium par spectrométrie de masse.

Le reste est repris dans D₂O. A ce stade on mesure le spectre RMN ¹H du brut de réaction de couleur brune. Le résidu est ensuite repris dans une solution aqueuse acide (pH 2,5)

puis filtré sur colonne Seppak C₁₈. La solution plus claire est ensuite évaporée sous pression réduite.

Le résidu est repris par H₂O/HCl 0,1 N puis injecté (500 µL) sur colonne semi-préparative HPLC Phenomenex Luna C₁₈ 5µm 100Å. Les conditions de purification par HPLC sont données dans le Tableau V-24 pour chacun des composés. Le système d'éluants utilisé est A = HCl pH 2,5 et B = CH₃CN.

<i>Entrée</i>	<i>Composé étudié</i>	<i>Gradient</i>	<i>t_r (min)</i>
1	Tyrosine	0→15%B en 15 min, 15%→100%B en 30 min	10,0
2	O-méthyl tyrosine	0→1%B en 15 min, 1%→15%B en 20 min, 15%→30%B en 30 min, 30%→60%B en 45 min, 60%→100%B en 45 min	27,7
3	DNS- <i>p</i> -crésol	5→77%B en 17 min, 77%→100%B en 20 min 100%B en 35 min	23,9
4	N-acétyl tyrosinamide	0→40%B en 10 min, 40%→50%B en 25 min, 50%→100%B en 30 min	13,6

Tableau V-24 : Conditions de purification sur colonne HPLC semi-préparative de la tyrosine et de ses analogues et temps de rétention correspondant.

VIII.3.2.c. Analyse des échantillons par RMN et SM

L'analyse par RMN ¹H du brut permet d'observer la dégradation et les produits formés, et du produit purifié permet de vérifier la pureté des composés à analyser par RMN ²H. Sur le produit purifié, on effectue une analyse par spectrométrie de masse (après dansylation le cas échéant sur trois injections de l'échantillon avec conjointement celle d'un témoin).

L'échantillon pour la RMN ²H est dissous dans 500 µL d'HCl 0,1N. Le nombre de scans dépend de la concentration en échantillon deutéré. Généralement, l'expérience requiert entre 2000-6000 scans.

Les spectres sont présentés dans le chapitre IV, les autres se trouvent dans les annexes.

Bibliographie du chapitre V

- ¹ W. A. Schroeder, J. R. Shelton, J. B. Shelton, J. Cormick, R. T. Jones, The Amino Acid Sequence of the Chain of Human Fetal Hemoglobin, *Biochemistry* **1963**, 2, 992-1008.
- ² W. A. Schroeder, J. R. Shelton, J. B. Shelton, B. Robberson, G. Apell, R. S. Fang, J. Bonaventura, The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase, *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 214, 397-421.
- ³ H. Schagger, G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **1987**, 166, 368-379.
- ⁴ O. Yamazaki, H. Togo, G. Nogami, M. Yokoyama, Novel Water-Soluble Organosilane Compounds as a Radical Reducing Agent in Aqueous Media, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1997**, 70, 2519-2523.
- ⁵ I. Ayala, K. Range, D. York, B. A. Barry, Spectroscopic Properties of Tyrosyl Radicals in Dipeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5496-5505.
- ⁶ D. A. Malencik, J. F. Sprouse, C. A. Swanson, S. R. Anderson, Dityrosine: Preparation, Isolation, and Analysis, *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 202-213.
- ⁷ G. Gill, A. A. Richter-Rusli, M. Ghosh, C. J. Burrows, S. E. Rokita, Nickel-Dependent Oxidative Cross-Linking of a Protein, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 302-309.
- ⁸ P. K. Glasoe, F. A. Long, Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxides, *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 188-190.

Annexes

Régiosélectivité de l'attaque par le DTT

Nous avons voulu analyser la régiosélectivité de la réparation par chacune des structures choisies pour le criblage par RMN ^2H . Comme point de départ, nous avons utilisé le DTT comme vecteur, à l'instar d'Anderson.^{1,2} A partir de nos résultats obtenus en spectrométrie de masse (cf. Chapitre III), nous avons voulu regarder la régiosélectivité de la réaction des HO^\bullet sur ce système. Les conditions opératoires pour l'irradiation et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau A-1.

	%Y	Inc. (%)	o/m
Y/DTT	70%	2,7% \pm 0,2%	3,5

Tableau A-1: Irradiation de Y en présence de DTT; [Y]=800 μM , $[\text{HO}^\bullet]_t = 1,77 \text{ mM}$, [DTT]=266 μM , [Pi]=10 mM, pD=7,2, bullage N_2O

On observe non seulement du marquage sur le cycle aromatique, majoritairement en *ortho*, mais aussi sur les positions méthylène, comme dans la littérature.² En revanche, on observe le marquage majoritairement sur le cycle, alors que les travaux d'Anderson donnent un rapport 70/30 pour la position méthylène. Les positions méthylène représentent 20% du marquage en *méta*.

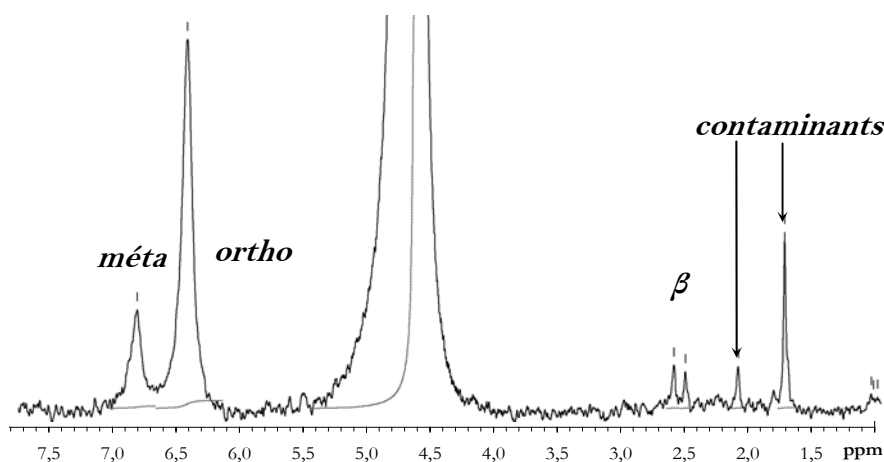


Figure A-A-2 : spectre RMN ^2H de Y irradiée en présence de DTT

Nos résultats sont en désaccord avec les travaux d'Anderson. En revanche, ils corroborent les approches spectrophotométriques de Solar sur l'attaque des radicaux hydroxyle sur la tyrosine, avec majoritairement des additions sur le cycle.³

¹ M. B. Goshe, Y. H. Chen, V. E. Anderson, *Biochemistry* **2000**, 39, 1761-1770.

² B. N. Nukuna, M. B. Goshe, V. E. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1208-1214.

³ S. Solar, W. Solar, N. Getoff, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 2091-2095.

Spectre RMN $^1\text{H}/^2\text{H}$ des solutions irradiées de tyrosine ou de ses analogues

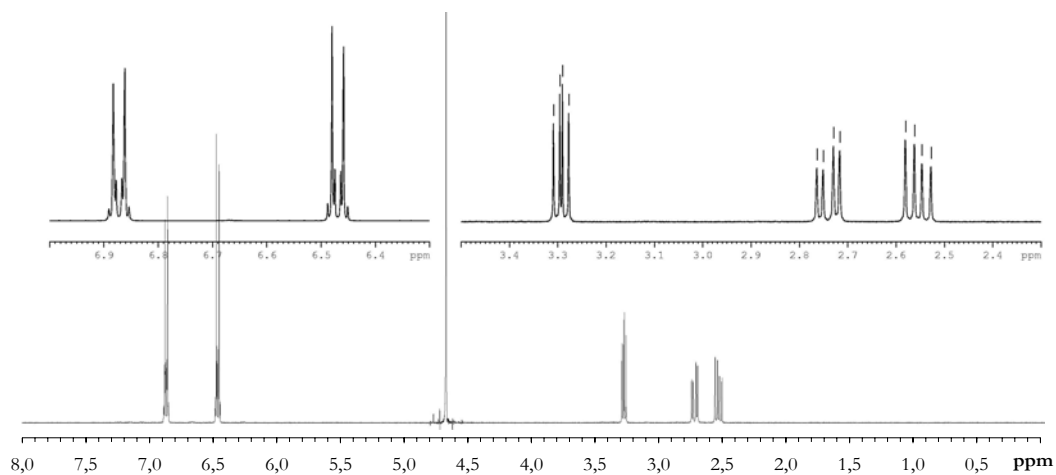


Figure A-3 : spectre RMN ^1H de Y non irradiée

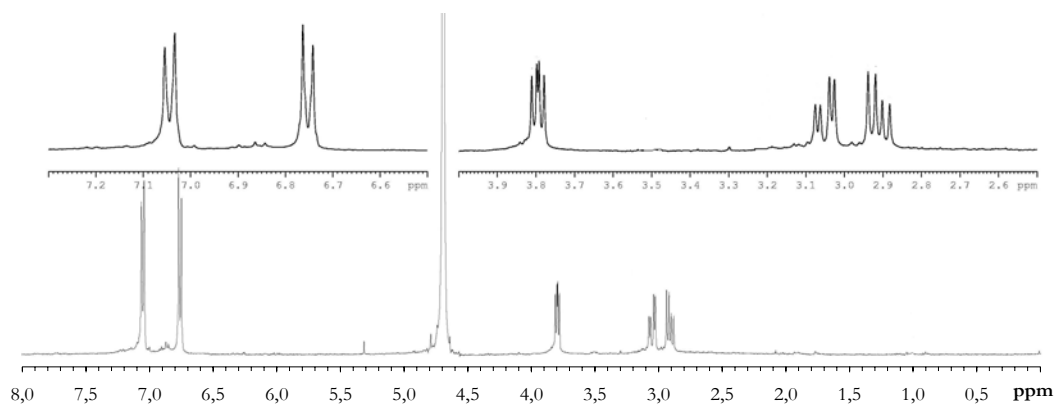


Figure A-4 : spectre RMN ^1H de Y irradiée ($[\text{Y}]=800\ \mu\text{M}$, $[\text{}^2\text{HO}^\bullet]=1,77\ \text{mM}$)

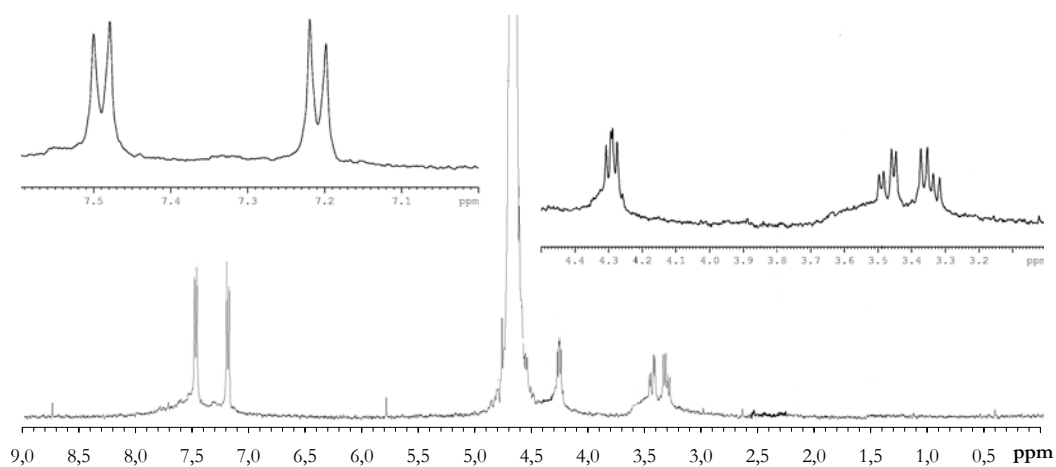


Figure A-5 : spectre RMN ^1H de Y irradiée en présence de KBr ($[\text{Y}]=800\ \mu\text{M}$, $[\text{}^2\text{HO}^\bullet]=1,77\ \text{mM}$)

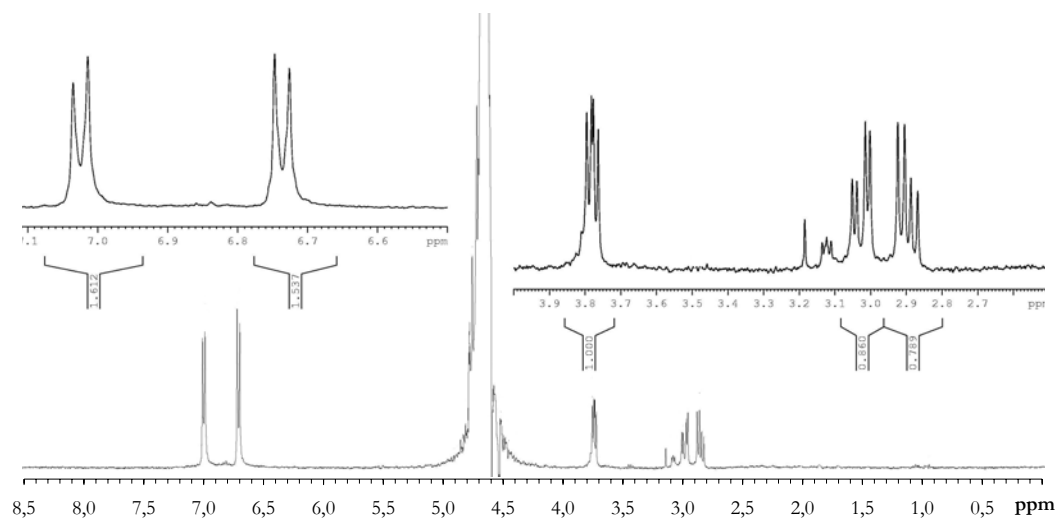


Figure A-6 : spectre RMN ^1H de Y irradiée sous argon ($[\text{Y}]=800\ \mu\text{M}$, $[\text{HO}^{\cdot}]=1,77\ \text{mM}$)

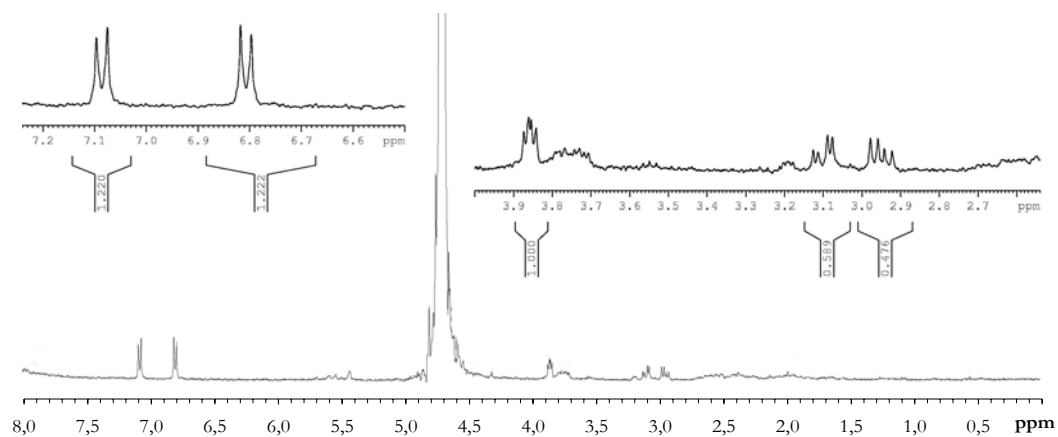


Figure A-7 : spectre RMN ^1H de Y irradiée avec NaHCO_2 (Ar) ($[\text{Y}]=800\ \mu\text{M}$, $[\text{HO}^{\cdot}]=1,77\ \text{mM}$)

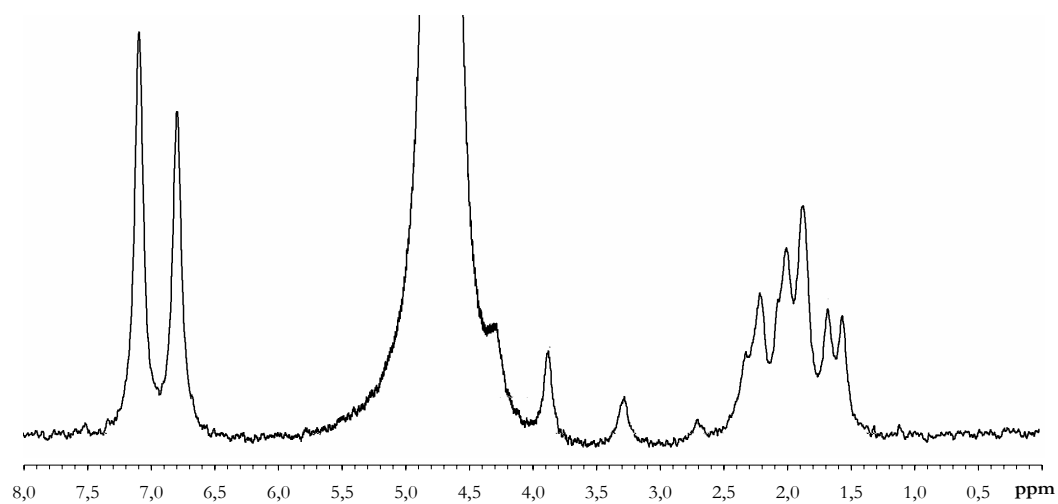


Figure A-8 : spectre RMN ^2H de Y irradiée avec NaHCO_2 (Ar)

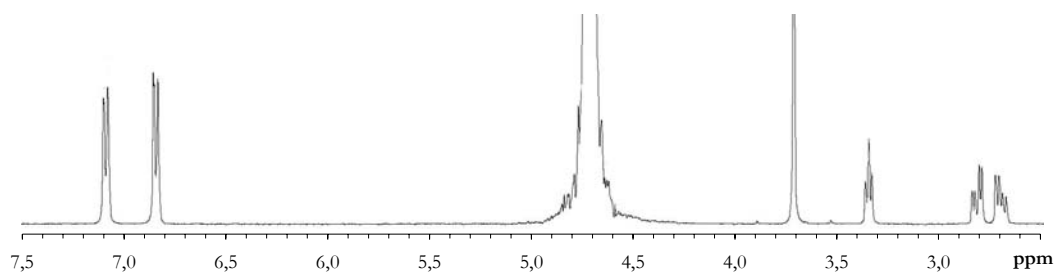


Figure A-9 : spectre RMN ^1H de la O-méthyl tyrosine non irradiée

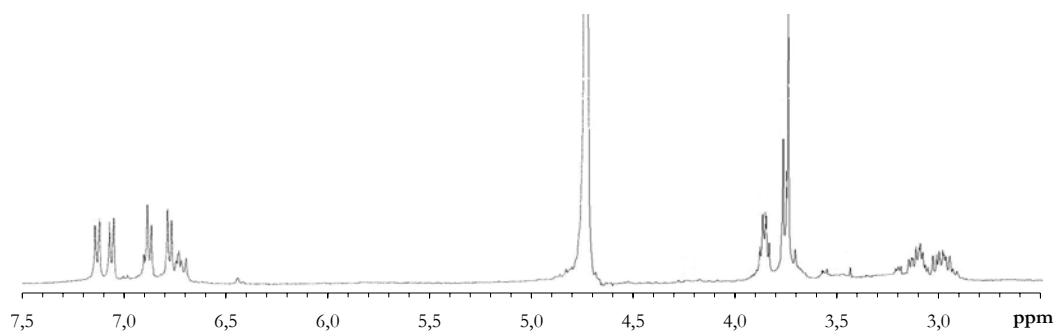


Figure A-10 : spectre RMN ^1H de la O-méthyl tyrosine irradiée ($[\text{OMT}] = 800 \mu\text{M}$, $[\text{HO}^\bullet] = 1,77 \text{ mM}$)

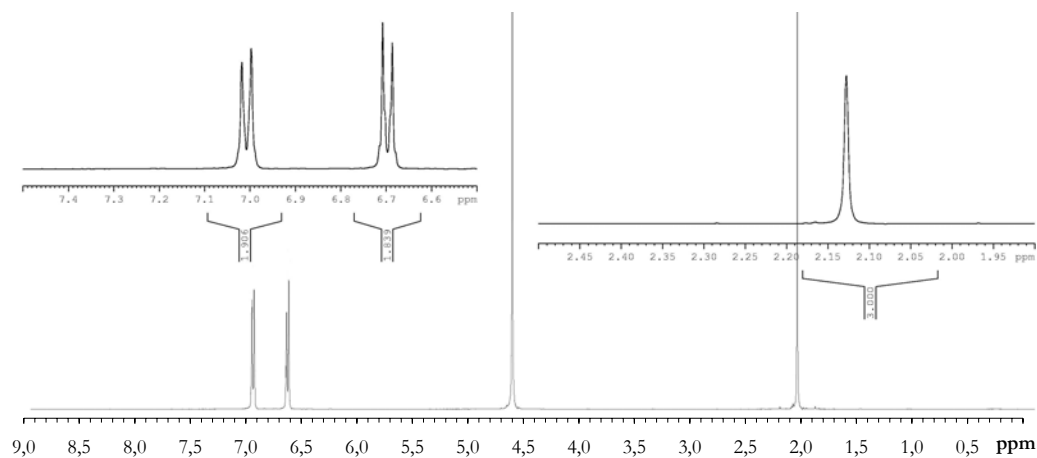


Figure A-11 : spectre RMN ^1H du *p*-crésol non irradié

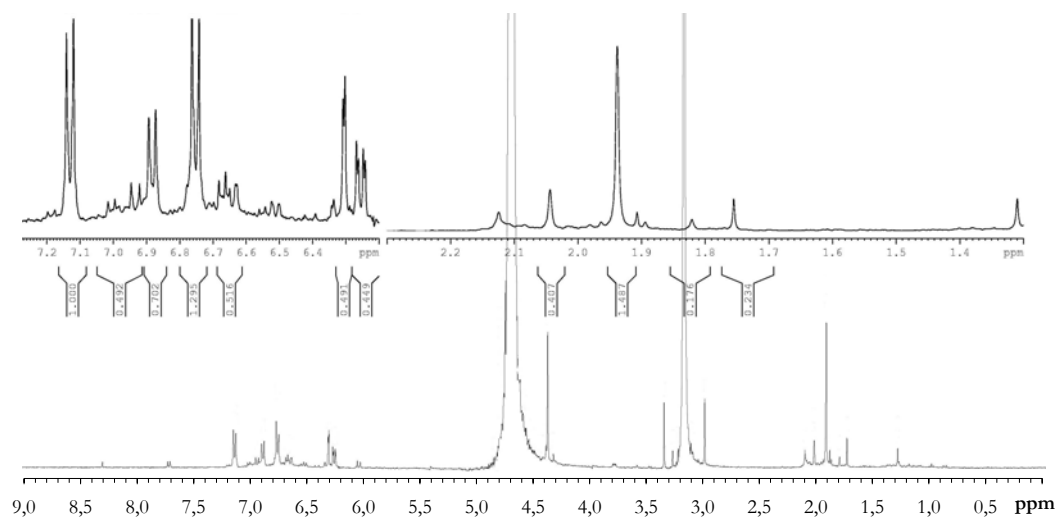


Figure A-12 : spectre RMN ^1H du *p*-crésol irradié ($[p\text{-Crésol}] = 800 \mu\text{M}$, $[\text{HO}^\bullet] = 1,77 \text{ mM}$)

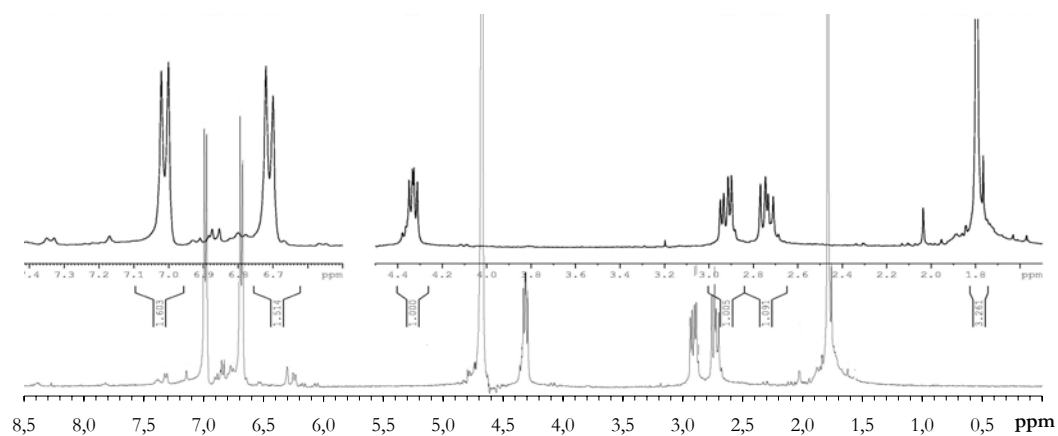


Figure A-13 : spectre RMN ^1H du NAYA irradié (pD 7)

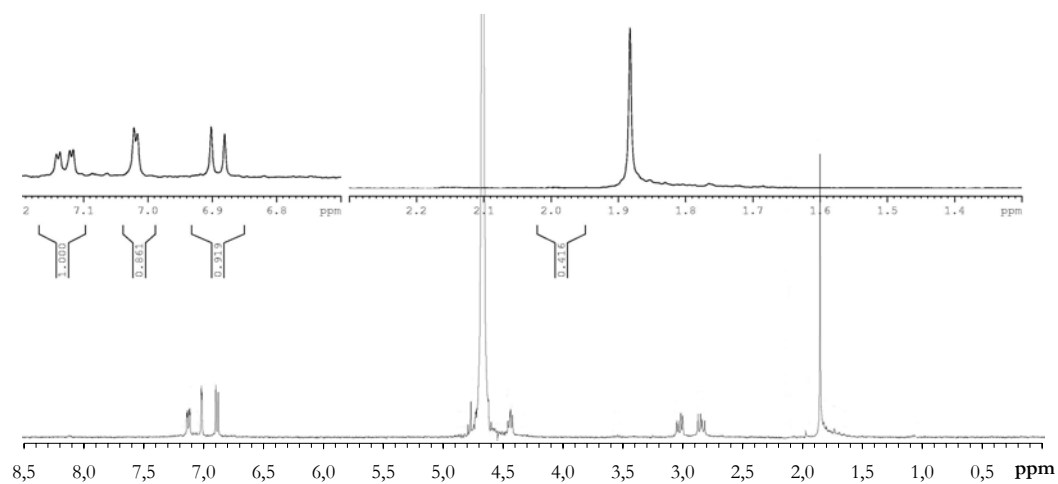


Figure A-14 : spectre RMN ^1H du diNAYA obtenu par irradiation à pD 3